

引用:王玲,高翔,高爽,汪唐顺,冯雪,王玉坤,孙萍,左禧萌,史晓光.槐耳多糖诱导三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞铁死亡的作用机制[J].中医药导报,2025,31(8):47-52.

# 槐耳多糖诱导三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞铁死亡的作用机制\*

王玲,高翔,高爽,汪唐顺,冯雪,王玉坤,孙萍,左禧萌,史晓光  
(北京中医药大学东直门医院,北京 100700)

[摘要] 目的:探讨槐耳多糖诱导三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞铁死亡的作用机制。方法:通过CCK-8实验检测槐耳多糖不同浓度、不同干预时间对MDA-MB-231细胞活性的影响;取对数生长期的MDA-MB-231细胞,随机分成6组,分别为对照组(NC组)、槐耳多糖组(PS-T组)、槐耳多糖+铁诱导剂组(PS-T+Erastin组)、铁诱导剂组(Erastin组)、紫杉醇组(PTX组)和槐耳多糖+紫杉醇组(PS-T+PTX组),用克隆形成实验检测各组MDA-MB-231细胞的增殖情况;用铁死亡相关试剂盒检测细胞内亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的含量;通过JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测MDA-MB-231细胞的线粒体膜电位,并用流式细胞仪进行分析;用DCFH-DA探针检测活性氧(ROS)进行检测,并用荧光显微镜进行分析;用实时定量PCR仪检测MDA-MB-231细胞内p53 mRNA、SLC7A11 mRNA、GPX4 mRNA、TFR1 mRNA和DMT1 mRNA的表达情况。结果:与NC组比较,乳腺癌细胞的活力随槐耳多糖的浓度升高而逐渐降低( $P<0.05$ ),且24 h比48 h的作用更显著;与NC组比较,PS-T组、PS-T+Erastin组、Erastin组、PTX组和PS-T+PTX组的克隆形成率、GSH含量、线粒体膜电位以及GPX4 mRNA和SLC7A11 mRNA表达均显著下降,而 $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA含量、ROS水平以及DMT1 mRNA、TFR1 mRNA和p53 mRNA表达则显著升高( $P<0.05$ );与PS-T组比较,PS-T+Erastin组和PS-T+PTX组的克隆形成率、GSH含量、线粒体膜电位以及GPX4 mRNA和SLC7A11 mRNA表达均下调,而 $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA含量、ROS水平以及DMT1 mRNA、TFR1 mRNA和p53 mRNA表达则上调( $P<0.05$ )。结论:槐耳多糖可以诱导三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞的铁死亡,其作用机制可能与 $\text{Fe}^{2+}$ 积累和脂质过氧化相关。

[关键词] 乳腺恶性肿瘤;槐耳多糖;铁死亡;线粒体膜电位;脂质过氧化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)08-0047-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.08.008

## Mechanism of Sophora Polysaccharide Inducing Ferroptosis in Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

WANG Ling, GAO Xiang, GAO Shuang, WANG Tangshun, FENG Xue, WANG Yukun,  
SUN Ping, ZUO Ximeng, SHI Xiaoguang  
(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of ferroptosis induced by sophora polysaccharides in triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. Methods: CCK-8 assay was used to detect the effects of different concentrations and different times of polysaccharides on the activity of MDA-MB-231 cells. The MDA-MB-231 cells in logarithmic growth phase were randomly divided into 6 groups, including control group (NC group), sophora polysaccharide group (PS-T group), sophora polysaccharide + iron induction dose group (PS-T+Erastin group), iron inducer group (Erastin group), paclitaxel group (PTX group) and sophora polysaccharide + paclitaxel group (PS-T+PTX group). The proliferation of MDA-MB-231 cells in each group was detected by clonal formation assay. The contents of ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were detected with ferroptosis-related kits. The mitochondrial membrane potential of MDA-MB-231 cells was detected

\*基金项目:国家自然科学基金项目(82474510);湖北陈孝平科技发展基金会专项基金项目(CXPJJH12000002-2020010);北京中医药大学青年教师项目(2022-UCMXJKY009)

通信作者:史晓光,男,主任医师,研究方向为中西医结合防治乳腺相关疾病

by JC-1 mitochondrial membrane potential detection kit and analyzed by flow cytometry. DCFH-DA probe was used to detect reactive oxygen (ROS), and fluorescence microscope was used for analysis. The p53 mRNA, SLC7A11 mRNA, GPX4 mRNA, TFR1 mRNA and DMT1 mRNA levels of MDA-MB-231 were detected by real-time quantitative PCR instrument. Results: Compared with NC group, the viability of breast cancer cells decreased gradually with the increase of the concentration of sophora polysaccharides ( $P<0.05$ ), and the effect was more significant in 24 h than in 48 h. Compared with NC group, the clone formation rate, GSH content, mitochondrial membrane potential, GPX4 mRNA expression and SLC7A11 mRNA expression decreased in PS-T group, PS-T+Erastin group, Erastin group, PTX group and PS-T+PTX group, while  $Fe^{2+}$ , MDA content, ROS level, DMT1 mRNA expression, TFR1 mRNA expression and p53 mRNA expression were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with PS-T group, the clonogenic rate, GSH content, mitochondrial membrane potential, GPX4 mRNA expressions and SLC7A11 mRNA expressions were down-regulated in PS-T+Erastin group and PS-T+PTX group, while  $Fe^{2+}$ , MDA content, ROS levels, DMT1 mRNA expression, TFR1 mRNA expression, and p53 mRNA expression were up-regulated ( $P<0.05$ ). Conclusion: Sophora polysaccharides can induce ferroptosis in triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells, and its mechanism may be related to  $Fe^{2+}$  accumulation and lipid peroxidation.

[Keywords] malignant tumors of the breast; sophora polysaccharides; ferroptosis; mitochondrial membrane potential; lipid peroxidation

乳腺恶性肿瘤(breast cancer, BC), 简称乳癌, 是女性群体中极为常见的恶性肿瘤之一。在全球范围来看, 其发病率与死亡率呈现出逐年攀升的态势<sup>[1]</sup>。2020年中央癌症协会和2021年国家卫生统计中心所发布的数据显示, 乳腺癌的发病率已然跃居女性恶性肿瘤之首, 同时, 它也是致使女性因癌症死亡的关键原因<sup>[2]</sup>。鉴于乳腺恶性肿瘤存在预后差、容易复发和转移等特点, 积极探寻新型的治疗方法已然成为当务之急。近些年来, 中草药研究的不断深入, 为肿瘤治疗带来了新的契机。槐耳多糖(the polysaccharides of *trametes robinio-phila murr*, PS-T)作为传统中草药槐耳的主要成分之一, 受到了诸多关注。已有多项研究表明槐耳多糖在治疗肝癌、肺癌、结直肠癌等<sup>[3-5]</sup>方面都展现出了抗肿瘤作用。另有研究发现, 槐耳多糖能够对乳腺癌的生物学行为产生影响<sup>[6]</sup>, 尤其在治疗三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)方面更是具备巨大的潜力<sup>[7-9]</sup>。而槐耳多糖是临床常用药物槐耳颗粒的主要成分。在临床实践中, 槐耳颗粒常被用于治疗TNBC, 并且已有研究证实其对TNBC的治疗效果<sup>[10-11]</sup>, 然而其具体作用机制仍未阐明。铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖性的脂质过氧化积累诱发的新型细胞死亡方式, 正逐渐成为研究热点<sup>[12]</sup>。越来越多的证据显示, 三阴性乳腺癌与铁死亡机制之间存在着紧密的关联。有研究<sup>[13]</sup>发现, 红景天苷能通过PI3K/Akt/mTOR信号通路使TNBC对铁死亡敏感。YE S Y等<sup>[14]</sup>也证实了冬凌草甲素可通过调节氧化应激信号通路JNK/Nrf2/HO-1促进RSL3诱导的TNBC细胞铁死亡。然而, 关于槐耳提取物PS-T治疗TNBC的铁死亡机制目前尚无相关报道。因此, 本文以三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞为研究对象, 用PS-T干预MDA-MB-231细胞, 观察PS-T对MDA-MB-231细胞铁死亡的影响, 以期为其临床治疗提供新的理论依据和潜在治疗靶点。

## 1 材料与方法

1.1 细胞培养 三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞来自北京中医药大学史晓光课题组保存细胞系, 用含10%胎牛血清的

DMEM培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

### 1.2 药物与仪器

1.2.1 药物 槐耳多糖(上海源叶公司, 批号: N06GS166423, 纯度60%); 铁诱导剂(Erastin, 批号: 81854)、紫杉醇(paclitaxel, PTX, 批号: 191930-58-2)均购自MCE公司; CCK-8试剂盒(批号: 22319483)、铁试剂盒(批号: 23081840)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号: 23081981)、谷胱甘肽(glu-tathione, GSH)试剂盒(批号: 23081920)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(批号: 23072184)均购自Biosharp公司; JC-1试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 批号: 120822230175)。

1.2.2 主要仪器 5%CO<sub>2</sub>培养箱(长沙华曦电子科技有限公司, 型号: YCP系列气套二氧化碳培养箱); 医用荧光定量PCR仪[鲲鹏(徐州)科学仪器有限公司, 型号: ArchimedX4]; 流式检测仪(必达科公司, 型号: BeamCyte-1026); 荧光显微镜(Nikon公司, 型号: ECLIPSE Ci); 酶标仪(BIORAD公司, 型号: Model 550); 离心机(恒诺仪器公司, 型号: AXTGL16M); 高速冷冻型微量离心机(SCIOLOGEX公司, 型号: CF1524R); 显微镜(广州明慧公司, 型号: NIB610)。

1.3 CCK-8检测 在96孔板中每孔接种 $1 \times 10^4$ 个细胞, 每组设6个复孔, 待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度PS-T(0、2、4、8、16、32、64、128  $\mu\text{mol/L}$ ), 继续培养24 h或48 h, 然后每孔避光加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8试剂, 37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育1 h, 在450 nm波长下用分光光度计检测吸光度值(optical density, OD)。细胞存活率 $\% = (\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{NC组}}) / (\text{OD}_{\text{NC组}} - \text{OD}_{\text{NC组}})$ 。重复3次。

1.4 克隆形成实验 在6孔板中每孔接种5 000个细胞, 培养24 h后, 将其随机分为6组, 即对照组(NC组)、槐耳多糖组(PS-T, 32  $\mu\text{g/mL}$ )、槐耳多糖+铁诱导剂组(PS-T+Erastin: 32  $\mu\text{g/mL}$  + 2  $\mu\text{g/mL}$ )、铁诱导剂组(Erastin, 2  $\mu\text{g/mL}$ )、紫杉醇组(PTX, 2.5  $\mu\text{mol/mL}$ )、槐耳多糖+紫杉醇组(PS-T+PTX: 32  $\mu\text{g/mL}$  + 2.5  $\mu\text{mol/mL}$ ), 分别加入相应的药物进行培养, 每3 d换一次液, 培养14 d, 然后用4%多聚甲醛固定30 min, 再用结晶紫染色

30 min,拍照,重复3次。最后用Image J软件统计和分析细胞克隆面积。

**1.5  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA和GSH试剂盒检测** 按“1.4”项下方法进行分组、干预,培养细胞至对数期,经消化后收集到离心管内,离心后弃去上清,取 $5 \times 10^6$ 个细胞加入1 mL提取液,超声波破碎细胞,12 000 r/min,4 ℃离心15 min(离心半径为10 cm),取上清液,置冰上待测。按要求加入96孔板中,立即混匀,静置。在酶标仪波长为412 nm下读取GSH吸光度值A,  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。在波长为562 nm读取 $\text{Fe}^{2+}$ 吸光度值A。在波长532 nm和600 nm处读取MDA吸光度值A,  $\Delta A = A_{532} - A_{600}$ 。重复3次。

**1.6 ROS检测** 按“1.4”项下方法进行分组、干预,在共聚焦皿中接种细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/孔,贴壁后,加药干预24 h,每皿加入含有H2DCFDA的无血清培养基,使其终浓度为10  $\mu\text{mol/L}$ ,37 ℃、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育30 min,用无血清培养基洗涤2次,使用荧光显微镜获得图像。重复3次。最后用Image J软件计算平均荧光强度。

**1.7 JC-1检测线粒体膜电位** 按“1.4”项下方法进行分组、干预,在6孔板中每孔接种细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个,待贴壁后,加入含有JC-1的无血清培养基重悬细胞,颠倒混匀,37 ℃孵育20 min,离心(3 000 r/min,4 ℃离心4 cm,离心半径为10 cm),去上清,PBS洗涤2次,适量缓冲液重悬细胞,置入流式细胞仪,观察红/绿荧光。重复3次。

**1.8 RT-qPCR检测铁死亡相关基因表达** 按“1.4”项下方法进行分组、干预,用Trizol提取各组细胞的总RNA,并测定RNA浓度。根据反转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA,反应条件为:25 ℃ 10 min,55 ℃ 15 min,85 ℃ 5 min,接着以cDNA为模板进行扩增。加入引物等反应体系,混匀,上机。设定反应程序为:预变性95 ℃ 30 s;变性95 ℃ 10 s;退火及延伸60 ℃ 30 s。PCR引物序列见表1。

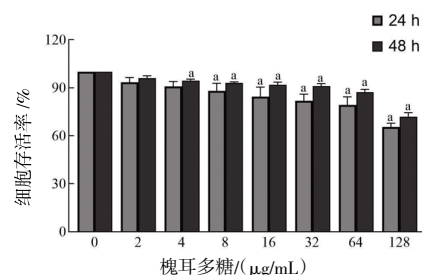
表1 PCR 引物序列

目的基因	引物序列	扩增产物长度/bp
p53	正义链:CAGCAGATGAGACGGAGTTGT 反义链:TCATCCAAATACTCCACACGC	124
SLC7A11	正义链:TCTCCAAAGGAGGTTACCTGC 反义链:AGACTCCCCTCAGTAAAGTGAC	120
GPX4	正义链:GAGGCAAGACCGAAGTAACTAC 反义链:CCGAAGTGGTTACACGGAA	123
DMT1	正义链:CCAGTAATGAGTGACTTTGCCAA 反义链:GCAGCCACCACATATAATGCC	100
TFR1	正义链:AGTTGAACAAAGTGGCAGGACAG 反义链:AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTCA	143
GAPDH	正义链:GGGGCTCTCCAGAACATC 反义链:TGACACGTTGGCATGG	112

**1.9 统计学方法** 采用GraphPad Prism 9.5.1进行数据分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PS-T对MDA-MB-231细胞的活性影响** 与NC组比较,随着PS-T浓度的增加,MDA-MB-231细胞的存活率逐渐降低( $P < 0.05$ ),呈浓度依赖性,且24 h的抑制效果比48 h效果更显著。因此,选择32  $\mu\text{g/mL}$  PS-T进行后续实验。(见图1)



注:与0  $\mu\text{g/mL}$  PS-T比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图1 不同浓度 PS-T 对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.2 PS-T对MDA-MB-231细胞克隆形成的影响** 与NC组比较,PS-T组、PS-T+Erastin组、Erastin组、PTX组和PS-T+PTX组的克隆数减少( $P < 0.05$ );与PS-T组比较,PS-T+Erastin组和PS-T+PTX组的克隆显著减少( $P < 0.05$ )。(见图2~3)

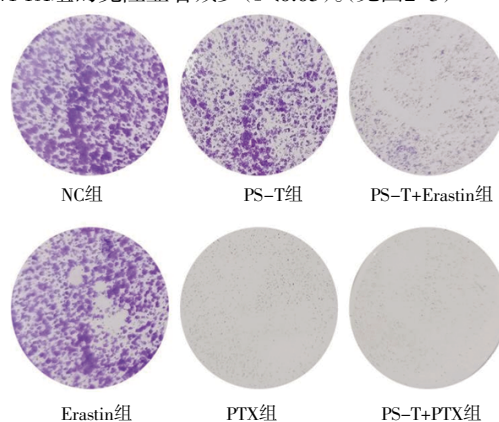
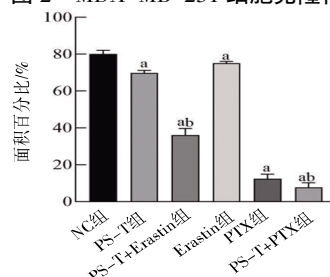


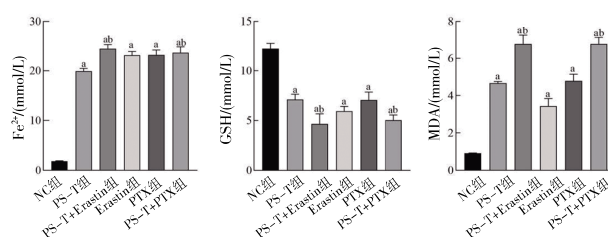
图2 MDA-MB-231 细胞克隆情况



注:与NC组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与PS-T组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图3 PS-T 对 MDA-MB-231 细胞克隆的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.3 PS-T对MDA-MB-231细胞 $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA和GSH含量的影响** 与NC组比较,PS-T组、PS-T+Erastin组、Erastin组、PTX组和PS-T+PTX组 $\text{Fe}^{2+}$ 和MDA的含量增加,GSH含量减少( $P < 0.05$ );与PS-T组比较,PS-T+Erastin组和PS-T+PTX组 $\text{Fe}^{2+}$ 和MDA含量显著增加,GSH含量显著减少( $P < 0.05$ )。(见图4)



注:与NC组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与PS-T组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图4 PS-T 对 MDA-MB-231 细胞  $\text{Fe}^{2+}$ 、GSH 和 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

2.4 PS-T对MDA-MB-231细胞ROS的影响 与NC组比较, PS-T组、PS-T+Erastin组、Erastin组、PTX组和PS-T+PTX组的绿荧光增强, ROS水平增加( $P<0.05$ ); 与PS-T组比较, PS-T+Erastin组和PS-T+PTX组的ROS水平显著增加( $P<0.05$ )。(见图5~6)表明槐耳多糖可以造成MDA-MB-231细胞的氧化损伤, 促进脂质过氧化, 细胞内氧化还原失衡, 导致铁死亡。

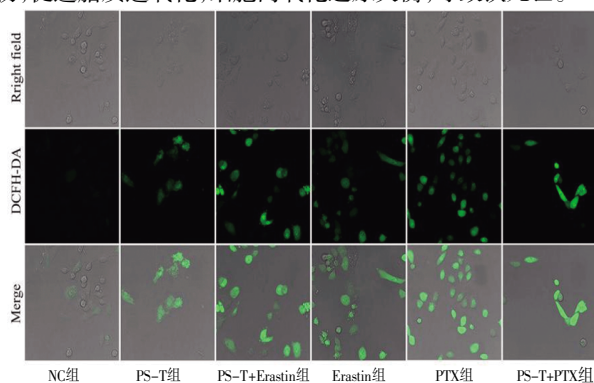
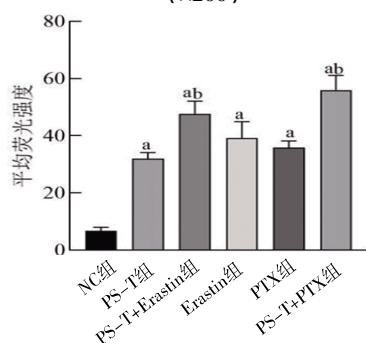


图5 PS-T对MDA-MB-231细胞ROS影响的荧光图  
( $\times 200$ )



注: 与NC组比较,  $^aP<0.05$ ; 与PS-T组比较,  $^bP<0.05$ 。

图6 P-T对MDA-MB-231细胞ROS的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

2.5 PS-T对线粒体膜电位的影响 为了评估槐耳多糖是否会引起乳腺癌细胞的线粒体膜电位的降低, 从而诱导铁死亡, 采用流式细胞仪检测上述各组乳腺癌MDA-MB-231细胞的线粒体膜电位, 若线粒体膜电位由红色荧光转变为绿色荧光, 表示线粒体膜电位降低。结果显示: 与NC组比较, PS-T组、PS-T+Erastin组、Erastin组、PTX组和PS-T+PTX组的膜电位降低( $P<0.05$ ); 与PS-T组比较, PS-T+Erastin组和PS-T+PTX组的线粒体膜电位降低( $P<0.05$ )。(见图7~8)表明槐耳多糖可以破坏MDA-MB-231细胞的线粒体功能。

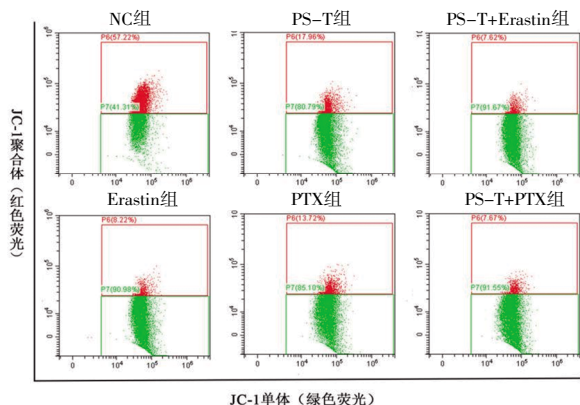
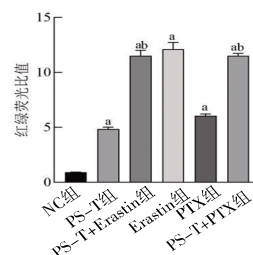


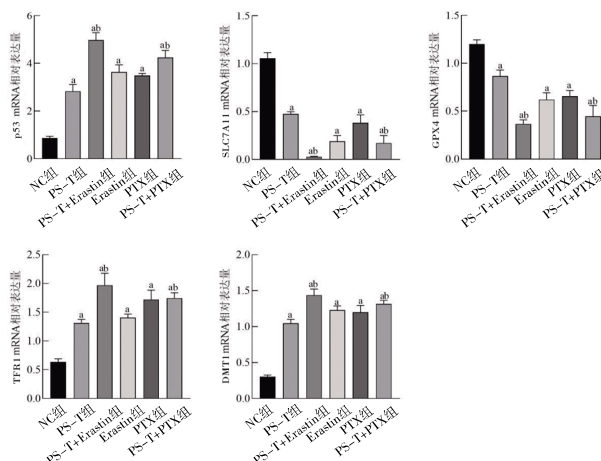
图7 PS-T对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位影响的流式图



注: 与NC组比较,  $^aP<0.05$ ; 与PS-T组比较,  $^bP<0.05$ 。

图8 PS-T对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位的影响  
( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

2.6 PS-T对MDA-MB-231细胞铁死亡相关mRNA表达水平的影响 与NC组比较, PS-T组、PS-T+Erastin组、Erastin组、PTX组和PS-T+PTX组p53 mRNA、TFR1 mRNA和DMT1 mRNA表达水平升高, SLC7A11 mRNA和GPX4 mRNA表达水平降低( $P<0.05$ ); 与PS-T组比较, PS-T+Erastin组和PS-T+PTX组p53 mRNA、TFR1 mRNA和DMT1 mRNA表达水平显著升高, SLC7A11 mRNA和GPX4 mRNA表达水平则显著降低( $P<0.05$ )。(见图9)



注: 与NC组比较,  $^aP<0.05$ ; 与PS-T组比较,  $^bP<0.05$ 。

图9 PS-T对MBA-MB-231细胞内p53 mRNA、SLC7A11 mRNA、GPX4 mRNA、TFR1 mRNA和DMT1 mRNA表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

### 3 讨论

TNBC作为乳腺癌的一个分子亚型, 占比为15%~20%, 是最具侵袭性的一类乳腺癌<sup>[15]</sup>。因其缺乏三种受体, 即雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)<sup>[15-16]</sup>, 导致其对化疗、放疗和靶向治疗等常规治疗并不敏感, 且易出现复发和转移、化学耐药以及预后不良等情况。因此, TNBC的治疗一直以来都是医学界关注的热点与攻关的难点所在, 研发新型治疗药物更是刻不容缓。

槐耳是一种生长在槐树上的真菌, 具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤的作用<sup>[17]</sup>。PS-T是槐耳最有效的抗癌活性成分, 目前已被用于各类癌症的治疗。研究<sup>[18]</sup>表明, PS-T能抑制宫颈癌细胞的增殖, 其机制可能与SPHK1/S1P/S1PR3信号通路有关。另外, 研究<sup>[19]</sup>发现, PS-T可能通过Akt/GSK3 $\beta$ /Snail信号轴抑制胰腺癌细胞增殖和促进凋亡。YANG L等<sup>[20]</sup>发现槐耳提取物可以通过NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 通路抑制MDA-MB-231细胞的生长, 诱导细胞

周期停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,并促进凋亡。HU B等<sup>[24]</sup>发现PS-T可以灭活ERα-36信号通路抑制MDA-MB-231细胞的增殖,影响肿瘤细胞的生物学行为。在本研究中,CCK-8实验和平板克隆实验显示,PS-T可以显著地抑制MDA-MB-231细胞的活性,进而抑制癌细胞的克隆形成,其机制可能与铁死亡有关。

铁死亡的概念首次由DIXON S J等<sup>[12]</sup>于2012年提出,主要描述由铁诱导剂(Erastin)触发的一种独特形式的细胞死亡。据报道<sup>[22]</sup>,Erastin可以选择性靶向MDA-MB-231细胞并有效诱导TNBC细胞中的铁死亡。从本质上来说,铁死亡过程涉及不稳定铁离子积累、脂质过氧化和抗氧化系统失衡<sup>[23]</sup>。其中不稳定铁离子积累是铁死亡的关键因素。铁是脂质过氧化的催化剂,细胞内的铁主要来自转铁蛋白受体介导的铁摄取、铁蛋白释放等过程。有研究发现,细胞外Fe<sup>3+</sup>可以通过转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1,TFR1)内吞转运至细胞内后变成Fe<sup>2+</sup>,然后在二价金属转运蛋白(divalent metal transporter 1,DMT1)的作用下进入不稳定铁池<sup>[24]</sup>。过多的铁随即通过芬顿反应(Fe<sup>2+</sup>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>→Fe<sup>3+</sup>+OH·+OH<sup>-</sup>)产生羟基自由基,引起氧化应激反应,产生大量的ROS,从而促进脂质过氧化<sup>[25]</sup>。本研究将Erastin作为正向调节剂,PTX作为阳性对照。结果表明PS-T可以增加MDA-MB-231细胞内的铁含量,并上调TFR1及DMT1的mRNA水平,说明PS-T可以促进癌细胞内不稳定铁离子的积累,而Erastin可以起协同作用。

另一方面,脂质过氧化是铁死亡的主要标志。当细胞处于某些氧化应激环境下,ROS大量产生,使得细胞膜和细胞器膜上的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA)过氧反应失控,形成脂质过氧化物。脂质过氧化物不稳定,会裂解形成终产物MDA,产生细胞毒性,进而诱发铁死亡<sup>[26]</sup>。此外,PTX作为TNBC的一线化疗药,会增加细胞内ROS水平,从而触发癌细胞铁死亡<sup>[27]</sup>。本研究结果显示PS-T可以促进MDA-MB-231细胞的ROS水平和MDA含量的增加,并与PTX的作用相似,PS-T+PTX比PS-T的效果更显著。

最后,抗氧化系统的失衡是铁死亡中的重要一环。生理条件下,胱氨酸/谷氨酸逆向转运体系统Xc(cystine/glutamate antiporter system Xc<sup>-</sup>)-GSH-谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase 4,GPX4)维持细胞的抗氧化稳态。其中,溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11,SLC7A11)是Xc<sup>-</sup>系统的核心成员,是合成GSH的一个关键前体。抑制SLC7A11可以减少细胞内的胱氨酸,最终导致GSH合成减少<sup>[28]</sup>。GPX4是参与减少脂质过氧化的核心蛋白质。GSH作为GPX4的辅助因子被抑制,导致GPX4的减少,细胞清除脂质过氧化的能力降低,导致ROS的过度积累,从而诱发铁死亡的发生<sup>[29]</sup>。过度堆积的ROS又促进线粒体膜电位崩解,线粒体内细胞色素C(cytochrome C,Cyt C)释放增加,线粒体凋亡通路被激活,p53蛋白表达上调<sup>[30]</sup>。活化后的p53可能通过募集到SLC7A11启动子区域,阻断SLC7A11的转录,抑制Xc<sup>-</sup>系统胱氨酸的摄取,抑制GSH合成,下调GPX4,触发铁死亡<sup>[16]</sup>。此外,有研究发现,槐耳可以上调p53的表达<sup>[31]</sup>,导致下游靶基因SLC7A11和GPX4接连被激活,而且p53/SLC7A11/GPX4信号轴已被证实参与TNBC的铁死亡过程<sup>[16]</sup>。由此形成了一个正反馈调节,进一步加速了铁死亡的进程。本研究结果显示,PS-T

可以抑制MDA-MB-231细胞GSH含量降低,下调SLC7A11 mRNA和GPX4 mRNA水平,上调p53mRNA水平,并降低线粒体膜电位,说明PS-T可以使抗氧化系统失衡,同时降低线粒体膜电位。该机制可能与p53/SLC7A11/GPX4信号轴有关。

本研究结果表明,PS-T可能通过p53/SLC7A11/GPX4通路抑制MDA-MB-231细胞的增殖,从而激发MDA-MB-231细胞内不稳定铁离子的过度积累,同时促进脂质过氧化,使抗氧化系统失衡,线粒体膜电位降低,进而诱导铁死亡的发生。其中铁诱导剂可以起协同作用,中西医结合比单用效果更显著。

## 参考文献

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin,2024,74(1):12-49.
- [2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin,2024,74(3):229-263.
- [3] LI H W, YOU J, WEI Y F, et al. Huaier improves the efficacy of anti-PD-L1 Ab in the treatment of hepatocellular carcinoma by regulating tumor immune microenvironment[J]. Phytomedicine,2024,123:155189.
- [4] WU T, LIU S, CHEN W, et al. Huaier suppresses cell viability, migration and invasion in human non-small cell lung cancer via lncRNA DLEU2/miR-212-5p/ELF3 axis[J]. Int J Med Sci,2024,21(2):319-331.
- [5] FENG Q, HUO M, YAN X, et al. Huaier regulates oxaliplatin resistance in colorectal cancer by regulating autophagy and inhibiting the Wnt/β-catenin signalling pathway[J]. Front Biosci (Landmark Ed),2024,29(1):15.
- [6] LUO K F, ZHOU L X, WU Z W, et al. Molecular mechanisms and therapeutic applications of Huaier in breast cancer treatment[J]. Front Pharmacol,2023,14:1269096.
- [7] LI C, WANG X L, XING L Y, et al. Huaier-induced suppression of cancer-associated fibroblasts confers immunotherapeutic sensitivity in triple-negative breast cancer[J]. Phytomedicine,2024,135:156051.
- [8] TIAN Y, WU J, ZENG L J, et al. Huaier polysaccharides suppress triple-negative breast cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition by inducing autophagic degradation of Snail[J]. Cell Biosci,2021,11(1):170.
- [9] LI C, WANG X L, CHEN T, et al. Huaier induces immunogenic cell death via CircCLASP1/PKR/eIF2α signaling pathway in triple negative breast cancer[J]. Front Cell Dev Biol,2022,10:913824.
- [10] 殷雨来,赵春智,张嘉澍,等.槐耳颗粒联合免疫治疗用于晚期三阴性乳腺癌解救治疗的临床分析[J].中医肿瘤学杂志,2024,6(2):33-41.
- [11] 陆家凤,张惟郁,何乐,等.槐耳颗粒辅助治疗乳腺癌的疗



- 效及安全性分析[J].浙江中医药大学学报,2022,46(6):677-685.
- [12] 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.
- [13] HUANG G Q, CAI Y W, REN M H, et al. Salidroside sensitizes Triple-negative breast cancer to ferroptosis by SCD1-mediated lipogenesis and NCOA4-mediated ferritinophagy[J]. *J Adv Res*,2024:S2090-S1232.
- [14] YE S Y, HU X Y, SUN S W, et al. Oridonin promotes RSL3-induced ferroptosis in breast cancer cells by regulating the oxidative stress signaling pathway JNK/Nrf2/HO-1[J]. *Eur J Pharmacol*,2024,974:176620.
- [15] ZHOU T J, ZHANG M M, LIU D M, et al. Glutathione depletion and dihydroorotate dehydrogenase inhibition actuated ferroptosis-augment to surmount triple-negative breast cancer[J]. *Biomaterials*,2024,305:122447.
- [16] LEI M, ZHANG Y L, HUANG F Y, et al. Gankyrin inhibits ferroptosis through the p53/SLC7A11/GPX4 axis in triple-negative breast cancer cells[J]. *Sci Rep*,2023,13:21916.
- [17] JI H, MA W, ZHENG A Y, et al. The role and molecular mechanism of *Trametes Robiniophila* Murr (Huaier) in tumor therapy[J]. *J Ethnopharmacol*,2024,334:118578.
- [18] 李丽品,马素艳,安入征.槐耳多糖调节SPHK1/S1P/S1PR3信号通路对宫颈癌细胞恶性生物学行为的影响[J].河北医学,2024,30(3):411-416.
- [19] 雷蕾,高彦茹,蔡洲,等.槐耳多糖通过抑制AKT/GSK3 $\beta$ /Snail信号通路抑制胰腺癌细胞增殖和上皮间质转化[J].现代肿瘤医学,2023,31(24):4536-4541.
- [20] YANG L, SONG Z, WANG X, et al. Huaier extract enhances the treatment efficacy of paclitaxel in breast cancer cells via the NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  pathway[J]. *Oncol Rep*,2017,38(6):3455-3464.
- [21] HU B, YAN W, WANG M, et al. Huaier polysaccharide inhibits the stem-like characteristics of ER $\alpha$ -36high triple negative breast cancer cells via inactivation of the ER $\alpha$ -36 signaling pathway[J]. *Int J Biol Sci*,2019,15(7):1358-1367.
- [22] DING Y, CHEN X, LIU C, et al. Identification of a small molecule as inducer of ferroptosis and apoptosis through ubiquitination of GPX4 in triple negative breast cancer cells[J]. *J Hematol Oncol*,2021,14(1):19.
- [23] ZHOU Q, MENG Y, LI D, et al. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies[J]. *Signal Transduct Target Ther*,2024,9(1):55.
- [24] SUN Y, REN Y, SONG L Y, et al. Targeting iron-metabolism: A potential therapeutic strategy for pulmonary fibrosis[J]. *Biomed Pharmacother*,2024,172:116270.
- [25] LEI G, ZHUANG L, GAN B Y. The roles of ferroptosis in cancer: Tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions[J]. *Cancer Cell*,2024,42(4):513-534.
- [26] XU X, XU X D, MA M Q, et al. The mechanisms of ferroptosis and its role in atherosclerosis[J]. *Biomed Pharmacother*,2024,171:116112.
- [27] WEN Y Y, LI K M, NI M N, et al. Dendritic polylysine with paclitaxel and triptolide codelivery for enhanced cancer ferroptosis through the accumulation of ROS[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*,2024,16(16):14.
- [28] ZHANG H, PAN J N, HUANG S Y, et al. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced ferroptosis through the SLC7A11/GSH/GPx4 pathway by Keap1 S-sulfhydration and Nrf2 activation[J]. *Redox Biol*,2024,70:103066.
- [29] ZHANG W, LIU Y, LIAO Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases[J]. *Biomed Pharmacother*,2024,174:116512.
- [30] 张超男,李洪霖,刘素彤,等.虎七散诱导食管癌EC9706细胞线粒体凋亡和铁死亡的研究[J].中药药理与临床,2024,40(8):19-28.
- [31] QIN X, CHEN X, WANG F, et al. Huaier inhibits autophagy and promotes apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia by down-regulating SIRT1[J]. *Heliyon*,2024,10(17):e37313.

(收稿日期:2024-12-17 编辑:罗英姣)

(上接第40页)南京医科大学学报(自然科学版),2023,43(4):459-467.

- [41] BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO V K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity[J]. *Nat Immunol*,2007,8(4):345-350.
- [42] VELDHOFEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells[J]. *Immunity*,2006,24(2):179-189.
- [43] 程浩,李雪飞,赵文鹏,等.ROR $\alpha$ 和ROR $\gamma$ t特性及介导Th17细胞分化研究新进展[J/OL].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(8):1413-1417.
- [44] 赵启航,梁瑞,李丹,等.Foxp3+调节性T细胞分化发育及其功能稳定性研究进展[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(1):1-9,80.
- [45] 韩玉生,李东东,侯志涛,等.丹溪痛风胶囊对胶原诱导性关节炎大鼠ROR $\gamma$ t和Foxp3蛋白表达的影响[J].实用医药杂志,2018,35(9):818-820.

(收稿日期:2024-12-27 编辑:刘国华)