

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003198

鸭胆子苦醇调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路
对皮肤鳞癌细胞铁死亡的影响谌程程¹, 何平², 黄宇婧¹, 陈爱军¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400016; 2. 陆军军医大学新桥医院整形美容科, 重庆 400042)

【摘要】目的:探讨鸭胆子苦醇调节核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)/溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)信号通路对皮肤鳞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, cSCC)细胞铁死亡的影响。**方法:**CCK-8 法检测 0、100、250、500、700、900 nmol/L 鸭胆子苦醇处理后 cSCC 细胞系 A431 细胞增殖率, 筛选出合适的鸭胆子苦醇作用浓度。体外培养的 A431 细胞随机分为对照组、鸭胆子苦醇低剂量组、鸭胆子苦醇高剂量组、特丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, TBHQ; Nrf2 激活剂)组、鸭胆子苦醇高剂量+TBHQ 组, 以鸭胆子苦醇和 TBHQ 分组处理后, 采用 CCK-8 法、Hoechst 33342 染色法检测各组 A431 细胞增殖与凋亡; 采用试剂盒检测各组 A431 细胞抗氧化因子[谷胱甘肽(glutathione, GSH)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)]水平及铁死亡指标[铁含量、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)]水平; 采用免疫印迹实验检测各组 A431 细胞增殖、凋亡及 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路相关蛋白表达。**结果:**与对照组相比, 鸭胆子苦醇低、高剂量组细胞增殖率、GSH 及 CAT、SOD 水平, 以及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及 Bcl-2、Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达均降低($P<0.05$), 凋亡率、铁含量、ROS 及 MDA 水平和 Bax 蛋白表达均升高($P<0.05$); 鸭胆子苦醇高剂量组细胞增殖率、GSH 及 CAT、SOD 水平, 以及 PCNA 及 Bcl-2、Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达相比鸭胆子苦醇低剂量组进一步降低($P<0.05$), 凋亡率、铁含量、ROS 及 MDA 水平和 Bax 蛋白表达进一步升高($P<0.05$); TBHQ 组细胞增殖率、GSH 及 CAT、SOD 水平, 以及 PCNA 及 Bcl-2、Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达升高($P<0.05$), 凋亡率、铁含量、ROS 及 MDA 水平和 Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。与鸭胆子苦醇高剂量组相比, 鸭胆子苦醇高剂量+TBHQ 组细胞增殖率、GSH 及 CAT、SOD 水平, 以及 PCNA 及 Bcl-2、Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达升高($P<0.05$), 凋亡率、铁含量、ROS 及 MDA 水平和 Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论:**鸭胆子苦醇通过下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路而促进铁死亡, 诱导 cSCC 细胞凋亡, 并抑制其增殖。

【关键词】鸭胆子苦醇; 核因子 E2 相关因子 2/溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4; 皮肤鳞癌; 铁死亡

【中图分类号】R739.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-08-27

Influence of brusatol on ferroptosis in cutaneous squamous cell carcinoma
cells by regulating Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathwayChen Chengcheng¹, He Ping², Huang Yujing¹, Chen Aijun¹

(1. Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Plastic Surgery, Xinqiao Hospital, Army Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the influence of brusatol on ferroptosis in cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) by regulating nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)/solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. **Methods:** The proliferation rate of human cSCC cell line A431 cells after treatment with 0, 100, 250, 500, 700, 900 nmol/L of brusatol was detected by CCK-8 method, and the appropriate concentration of brusatol was screened out. The A431 cells cultured *in vitro* were randomly separated into control group, low-dose brusatol group, high-dose brusatol group, tert-butylhydroquinone (TBHQ; Nrf2 activator) group, and high-dose brusatol+TBHQ group. After treatment with brusatol and TBHQ, respectively, the proliferation and apoptosis of A431 cells in each group were detected by CCK-8 method and Hoechst 33342 staining method; Kits were applied to detect the levels of antioxidant factors [glutathione (GSH), catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD)] and ferroptosis indicators [iron content, reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA)] in A431 cells in each group; the expressions of proliferation, apoptosis and Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway-related proteins of A431 cells in each group were detected by Western blot. **Results:** Compared with the control group, the cell proliferation rate, GSH, CAT, SOD levels, PCNA, Bcl-2, Nrf2, SLC7A11, and GPX4 protein expressions in

作者介绍: 谌程程, Email: chencc1991@126.com,

研究方向: 皮肤肿瘤。

通信作者: 陈爱军, Email: cajhx@aliyun.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230427.1637.002.html>

(2023-04-28)

the low and high dose brusatol groups were all decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, iron content, ROS and MDA levels, and Bax protein expression were all increased ($P<0.05$); the cell proliferation rate, GSH, CAT, SOD levels, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Bcl-2, Nrf2, SLC7A11, and GPX4 protein expressions in the high-dose brusatol group were further decreased than the low-dose brusatol group ($P<0.05$), and the apoptosis rate, iron content, ROS and MDA levels, and Bax protein expression were further increased ($P<0.05$); the cell proliferation rate, GSH, CAT, SOD levels, PCNA, Bcl-2, Nrf2, SLC7A11, and GPX4 protein expressions in TBHQ group were increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, iron content, ROS and MDA levels, and Bax protein expression were decreased ($P<0.05$). Compared with the high-dose brusatol group, the cell proliferation rate, GSH, CAT, SOD levels, PCNA, Bcl-2, Nrf2, SLC7A11, and GPX4 protein expressions in the high-dose brusatol alcohol+TBHQ group were increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate, iron content, ROS and MDA levels, and Bax protein expression were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Brusatol promotes ferroptosis, induces apoptosis of cSCC cells, and inhibits its proliferation by down-regulating Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway.

[Key words] brusatol; nuclear factor erythroid-2 related factor 2/solute carrier family 7 member 11/glutathione peroxidase 4; cutaneous squamous cell carcinoma; ferroptosis

皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, cSCC)是起源于皮肤表皮或其附属器官的一种非黑色素瘤性皮肤恶性肿瘤,多发于老年人群,头皮、颈面部、手背等暴露皮肤是其好发部位,少数为原发性皮肤癌,其余多数是慢性溃疡经久不愈癌变而来,具有转移风险且致死率较高^[1-3]。癌细胞具有逃避程序性细胞凋亡的特性,而铁死亡是一种以脂质过氧化和铁积累为特征的非凋亡性细胞死亡过程,诱导铁死亡的化合物可作为肿瘤的新型治疗药物^[4]。增加活性氧(reactive oxygen species, ROS)、脂质过氧化水平和铁积累可诱导 cSCC 细胞铁死亡,进而抑制其增殖,阻止荷瘤小鼠内肿瘤生长^[5]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)和谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)是铁死亡的关键调节因子,下调三者的表达可促进脂质过氧化和铁死亡,在体内外抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖活性^[6]。另外,下调 SLC7A11 和 GPX4 表达可通过激活自噬和铁死亡诱导非小细胞肺癌凋亡,并抑制其细胞增殖和肿瘤生长^[7]。研究显示, Nrf2 和 SLC7A11 在食管鳞癌中过度表达,与肿瘤生长、淋巴结转移、放射抵抗、患者总生存期缩短显著相关,过度激活 Nrf2 可通过减轻脂质过氧化和铁死亡而降低放射治疗的效果^[8],因而下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路可能是诱导铁死亡进而治疗 cSCC 的有效手段。鸦胆子苦醇是提取自鸦胆子果实中的一种苦木内酯类化合物,作为一种 Nrf2 抑制剂在抗肿瘤治疗中具有应用潜力,可通过阻断 STAT3 信号诱导头颈鳞状细胞癌细胞毒性^[9],还可有效抑制肺癌

细胞的 Nrf2 信号激活,并抑制其增殖^[10]。由此可知,鸦胆子苦醇可能用于治疗 cSCC,本文以不同剂量鸦胆子苦醇处理人 cSCC 细胞系 A431,探讨鸦胆子苦醇调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路对 cSCC 铁死亡的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人皮肤鳞癌细胞株 A431(货号 GOY-0498X)购自上海谷研实业有限公司;特丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, TBHQ;纯度 99.76%,货号 HY-100489)购自美国 MCE 公司;鸦胆子苦醇(纯度:HPLC \geq 98%,货号 IB0520)、Hoechst 33342 染色液(1 mg/mL,货号 C0031)、ROS 检测试剂盒(货号 CA1410)、DMEM 培养基(含双抗,货号 31600)、铁含量检测试剂盒(货号 BC4355)购自北京索莱宝科技有限公司;细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(货号 A003-4-1)、CCK-8 细胞活力检测试剂盒(货号 G021-1-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(货号 A001-3-1)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(货号 A006-2-1)、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试剂盒(货号 A007-1-1)购自南京建成生物工程研究所有限公司;兔源抗人 Anti-Nrf2 一抗(货号 ab137550)、兔源抗人 Anti- β -tubulin 一抗(货号 ab6046)、兔源抗人 Anti-SLC7A11 一抗(货号 ab175186)、HRP 偶联山羊抗兔二抗(货号 ab6721)、兔源 Anti-增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)-抗(货号 ab92552)、兔源抗人 Anti-GPX4 一抗(货号 ab125066)购自美国 Abcam 公司等。

酶标仪(型号 SHE-3000)购自北京赛尔福知心科技有限公司;倒置荧光显微镜(型号 BSF-60)购自上海巴拓仪器有限公司;实验室电泳仪电源(型号 DYY-12C)、P4 垂直蛋白电泳仪(型号 DYCZ-25E)、四板转印电泳仪(型号 DYCZ-40S)购自北京六一生物科技有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 通过 CCK-8 实验筛选合适的鸦胆子苦醇作用浓度 将 A431 细胞置于 40 °C 条件下快速解冻复苏,离心、洗涤后加入 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养至约 80% 细胞融合,以约 1×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板传代培养 12 h,加入终浓度 0、100、250、500、700、900 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 24 h^[11],以鸦胆子苦醇未处理细胞(0 nmol/L)作对照,使用 CCK-8 细胞活力检测试剂盒测定各孔吸光度,计算各浓度处理组细胞增殖率,公式为:细胞增殖率=药物处理组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.2 细胞分组处理后收集标本 传代 A431 细胞后,以约 2×10^5 个/孔的密度接种在 24 孔板中培养 12 h,随机分为对照组、鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组、TBHQ 组、鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组,对照组细胞不以任何药物处理,鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组细胞分别以 500、700 nmol/L 的鸦胆子苦醇处理,TBHQ 组细胞以 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBHQ 处理^[12],鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组以 700 nmol/L 的鸦胆子苦醇和 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBHQ 联合处理,各组细胞于处理 24 h 后收集细胞沉淀做标本备用。

1.2.3 检测各组细胞增殖与凋亡 细胞增殖检测:传代 A431 细胞后,以约 1×10^4 个/孔的密度接种在 96 孔板中培养 12 h,按照 1.2.2 中步骤对其进行分组处理 24 h,以 CCK-8 法检测各组细胞增殖率,具体方法参照 1.2.1。检测细胞凋亡:传代 A431 细胞后,以约 2×10^5 个/孔的密度接种在 24 孔板中培养 12 h,按照 1.2.2 中步骤对其进行分组处理 24 h,洗涤、固定后加入 Hoechst 33342 染色液孵育,再次洗涤后使用倒置荧光显微镜观察细胞形态并拍照,以 Image J 软件分析定量凋亡细胞数和总细胞数,计算各组细胞凋亡率:细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 检测各组细胞抗氧化因子 GSH、CAT、SOD 水平及铁死亡指标铁含量、ROS 水平、MDA 水平 取 1.2.2 中收集的各组细胞,分别加入 RIPA 裂解液,裂解后离心提取总蛋白,采用 BCA 法测出其浓度后每组取出 0.3 mL (各组剩余蛋白样品液存入 -80 °C),以铁含量检测试剂盒、GSH 测定试剂盒、CAT 测定试剂盒、SOD 活性检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、细胞 MDA 测定试剂盒分别测定其中铁含量及 GSH、CAT、SOD、SOD、MDA 水平,具体步骤遵照各自试剂盒说明书进行。

1.2.5 检测各组细胞增殖、凋亡及 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路相关蛋白表达 取出 1.2.4 中存入 -80 °C 的各组剩余蛋白样品液,以冰水浴缓慢解冻后每组取 20 μg 总蛋白变性、

上样、电泳、湿转,使蛋白分离后载于硝酸纤维素膜,以脱脂牛奶封闭其非特异抗原位点后裁下 Nrf2、SLC7A11、 β -tubulin、GPX4,分别孵育兔源抗人 Anti-Nrf2、Anti- β -tubulin、Anti-SLC7A11、Anti-GPX4 一抗、HRP 偶联山羊抗兔二抗,洗涤、显色、采集图像,采用 Image J 软件定量各组蛋白灰度值,以内参 β -tubulin 为基准量化其相对表达。

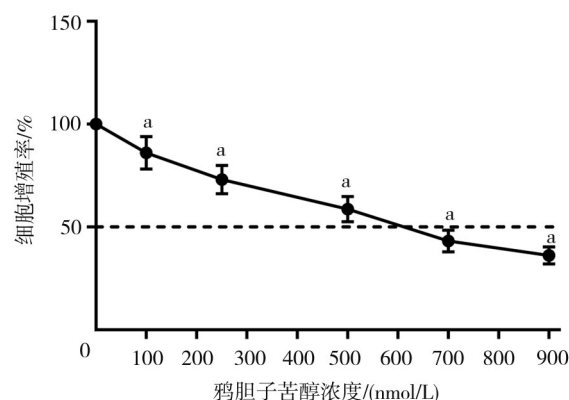
1.3 统计学处理

运用 Graph-Pad Prism 8.0 软件进行统计分析。本文实验数据均是计量资料,采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析进行多组间差异比较,采用 SNK- q 检验进行组间两两进一步差异比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 鸦胆子苦醇作用浓度确定

不同浓度的鸦胆子苦醇均可抑制 A431 细胞增殖,本文选择接近 IC_{50} 的 500、700 nmol/L 鸦胆子苦醇进行后续实验。结果如图 1 所示。



注:a,与 0 nmol/L 鸦胆子苦醇相比, $P < 0.05$

图 1 不同浓度鸦胆子苦醇对 A431 细胞增殖率的影响

2.2 鸦胆子苦醇对 A431 细胞增殖与凋亡的影响

与对照组相比,鸦胆子苦醇低、高剂量组细胞增殖率均降低 ($P < 0.05$),凋亡率均升高 ($P < 0.05$);鸦胆子苦醇高剂量组细胞增殖率相比鸦胆子苦醇低剂量组进一步降低 ($P < 0.05$),凋亡率进一步升高 ($P < 0.05$);TBHQ 组细胞增殖率升高 ($P < 0.05$),凋亡率降低 ($P < 0.05$)。与鸦胆子苦醇高剂量组相比,鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组细胞增殖率升高 ($P < 0.05$),凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 2、表 1。

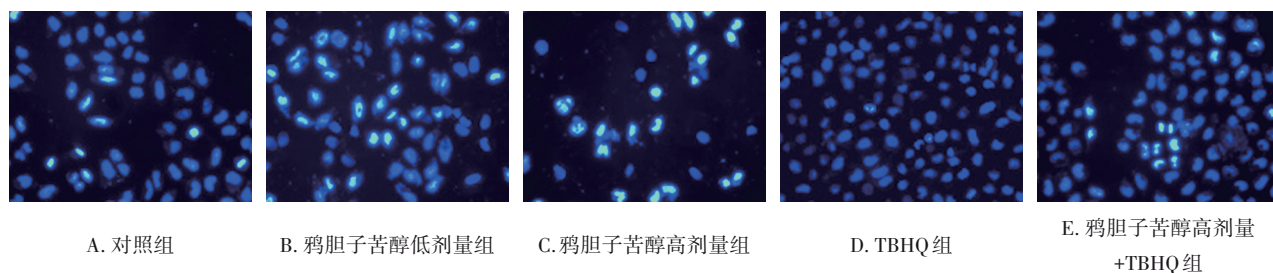


图 2 Hoechst 33342 染色检测各组 A431 细胞凋亡 (200 \times)

表 1 各组 A431 细胞增殖率与凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=6; \%$)

组别	增殖率	凋亡率
对照组	100.00 ± 0.00	8.52 ± 0.34
鸦胆子苦醇低剂量组	71.18 ± 11.35 ^a	38.23 ± 4.35 ^a
鸦胆子苦醇高剂量组	39.72 ± 4.83 ^{ab}	70.34 ± 7.93 ^{ab}
TBHQ 组	168.93 ± 16.54 ^a	0.51 ± 0.07 ^a
鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组	92.40 ± 13.72 ^c	15.35 ± 1.92 ^c
F 值	11.397	278.801
P 值	0.000	0.000

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与鸦胆子苦醇低剂量组相比, $P<0.05$;c:与鸦胆子苦醇高剂量组相比, $P<0.05$

2.3 鸦胆子苦醇对 A431 细胞抗氧化因子水平的影响

与对照组相比,鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组细胞 GSH、CAT、SOD 水平均降低($P<0.05$);鸦胆子苦醇高剂量组细胞 GSH、CAT、SOD 水平相比鸦胆子苦醇低剂量组进一步降低($P<0.05$);TBHQ 组细胞 GSH、CAT、SOD 水平升高($P<0.05$)。与鸦胆子苦醇高剂量组相比,鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组细胞 GSH、CAT、SOD 水平升高($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组 A431 细胞抗氧化因子 GSH、CAT、SOD 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6; \%$)

组别	GSH/ (nmol/mgprot)	CAT/ (U/mgprot)	SOD/ (U/mgprot)
对照组	24.86 ± 4.12	5.83 ± 0.65	7.21 ± 0.69
鸦胆子苦醇低剂量组	16.02 ± 1.73 ^a	3.21 ± 0.31 ^a	4.35 ± 0.43 ^a
鸦胆子苦醇高剂量组	5.25 ± 0.68 ^{ab}	0.73 ± 0.09 ^{ab}	0.81 ± 0.10 ^{ab}
TBHQ 组	35.98 ± 4.25 ^a	8.14 ± 0.42 ^a	10.57 ± 0.76 ^a
鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组	22.34 ± 3.80 ^c	5.39 ± 0.54 ^c	6.78 ± 0.52 ^c
F 值	72.815	237.958	259.712
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与鸦胆子苦醇低剂量组相比, $P<0.05$;c:与鸦胆子苦醇高剂量组相比, $P<0.05$

2.4 鸦胆子苦醇对 A431 细胞铁死亡的影响

与对照组相比,鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组细胞铁含量、ROS 及 MDA 水平升高($P<0.05$);鸦胆子苦醇高剂量组细胞铁含量、ROS 及 MDA 水平相比鸦胆子苦醇低剂量组进一步升高($P<0.05$);TBHQ 组细胞铁含量、ROS 及 MDA 水平降低($P<0.05$)。与鸦胆子苦醇高剂量组相比,鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组细胞铁含量、ROS 及 MDA 水平降低($P<0.05$)。见表 3。

2.5 鸦胆子苦醇对 A431 细胞增殖与凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比,鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组细胞 PCNA、Bcl-2 蛋白表达均降低($P<0.05$),Bax 蛋白表达均升高($P<0.05$);鸦胆子苦醇高剂量组细胞 PCNA、Bcl-2 蛋白表达相比鸦胆子苦醇低剂量组进一步降低($P<0.05$),

Bax 蛋白表达进一步升高($P<0.05$);TBHQ 组细胞 PCNA、Bcl-2 蛋白表达升高($P<0.05$),Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。与鸦胆子苦醇高剂量组相比,鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组细胞 PCNA、Bcl-2 蛋白表达升高($P<0.05$),Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。见图 3、表 4。

表 3 各组 A431 细胞铁含量、ROS 及 MDA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	铁含量/ ($\mu\text{mol/L}$)	ROS 水平/ (U/kgprot)	MDA/ (nmol/mgprot)
对照组	8.95 ± 1.23	1.12 ± 0.17	4.35 ± 0.36
鸦胆子苦醇低剂量组	15.78 ± 2.35 ^a	3.89 ± 0.35 ^a	8.73 ± 0.51 ^a
鸦胆子苦醇高剂量组	23.12 ± 3.46 ^{ab}	7.20 ± 0.54 ^{ab}	13.24 ± 0.72 ^{ab}
TBHQ 组	2.31 ± 0.52	0.23 ± 0.04	0.96 ± 0.15
鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组	9.34 ± 1.34 ^c	1.41 ± 0.26 ^c	4.91 ± 0.64 ^c
F 值	88.324	467.147	493.714
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与鸦胆子苦醇低剂量组相比, $P<0.05$;c:与鸦胆子苦醇高剂量组相比, $P<0.05$

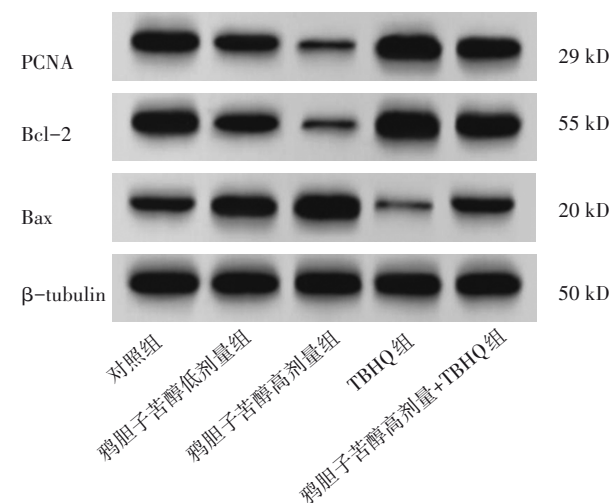


图 3 免疫印迹检测各组 A431 细胞增殖与凋亡相关蛋白表达

表 4 各组 A431 细胞增殖与凋亡相关蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PCNA/ β -tubulin	Bcl-2/ β -tubulin	Bax/ β -tubulin
对照组	0.96 ± 0.11	1.09 ± 0.15	0.45 ± 0.04
鸦胆子苦醇低剂量组	0.54 ± 0.05 ^a	0.62 ± 0.09 ^a	0.87 ± 0.13 ^a
鸦胆子苦醇高剂量组	0.13 ± 0.02 ^{ab}	0.10 ± 0.02 ^{ab}	1.35 ± 0.18 ^{ab}
TBHQ 组	1.40 ± 0.16	1.61 ± 0.22	0.08 ± 0.02
鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组	0.91 ± 0.12 ^c	1.04 ± 0.13 ^c	0.49 ± 0.06 ^c
F 值	124.565	99.523	126.896
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与鸦胆子苦醇低剂量组相比, $P<0.05$;c:与鸦胆子苦醇高剂量组相比, $P<0.05$

2.6 鸦胆子苦醇对 A431 细胞 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比,鸦胆子苦醇低剂量组、鸦胆子苦醇高剂量组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达均降低 ($P<0.05$); 鸦胆子苦醇高剂量组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达相比鸦胆子苦醇低剂量组进一步降低 ($P<0.05$); TBHQ 组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与鸦胆子苦醇高剂量组相比,鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。见图 4、表 5。

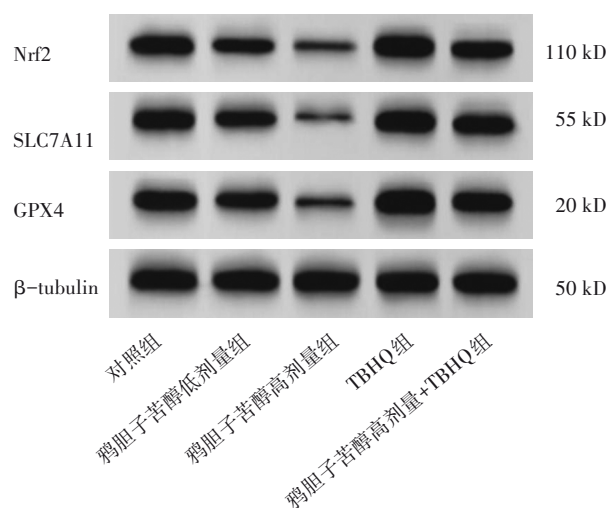


图 4 免疫印迹检测各组 A431 细胞 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号相关蛋白表达

表 5 各组 A431 细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Nrf2/ β-tubulin	SLC7A11/ β-tubulin	GPX4/ β-tubulin
对照组	0.88 ± 0.10	0.90 ± 0.14	1.02 ± 0.14
鸦胆子苦醇低剂量组	0.52 ± 0.06 ^a	0.53 ± 0.08 ^a	0.61 ± 0.10 ^a
鸦胆子苦醇高剂量组	0.17 ± 0.03 ^{ab}	0.14 ± 0.04 ^{ab}	0.18 ± 0.05 ^{ab}
TBHQ 组	1.31 ± 0.21	1.38 ± 0.20	1.54 ± 0.25
鸦胆子苦醇高剂量+TBHQ 组	0.83 ± 0.09 ^c	0.85 ± 0.11 ^c	0.97 ± 0.13 ^c
F 值	81.621	79.931	68.941
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组相比, $P<0.05$;b:与鸦胆子苦醇低剂量组相比, $P<0.05$;c:与鸦胆子苦醇高剂量组相比, $P<0.05$

3 讨论

随着环境污染、臭氧层破坏、人们室外活动增加,cSCC 的发病率逐年增加。由于 cSCC 具有转移到人体任意器官的能力,患者病情往往因发生转移而难以控制,致使手术、放化疗、光动力等临床治疗效果变差,因此探索开发新的治疗药物对于改善患

者预后至关重要^[13-14]。鸦胆子苦醇是具有明显抗癌活性的苦木内酯类化合物,提取自苦木科植物鸦胆子果实,近年来在肿瘤治疗中得到很多关注^[9-11]。研究显示鸦胆子苦醇呈浓度和时间依赖性地抑制结直肠癌细胞增殖,并可抑制其迁移和侵袭^[15]。鸦胆子苦醇还可抑制非小细胞肺癌细胞的生长^[16]。本文以 0、100、250、500、700、900 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 A431 细胞,均可降低其细胞增殖率,以 500、700 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 A431 细胞,可降低细胞增殖率、PCNA 及 Bcl-2 蛋白表达,升高细胞凋亡率、Bax 蛋白表达,且高剂量鸦胆子苦醇对上述指标作用更强。这一结果表明鸦胆子苦醇可增加促凋亡蛋白表达,降低抑凋亡蛋白表达,促进 A431 细胞凋亡,减弱其增殖活性,对 cSCC 发挥显著的抗癌功效,且剂量越高,功效越强。

铁死亡作为一种依赖活性氧和铁累积的新型细胞死亡类型,与癌细胞生长、凋亡关系密切,促进食管鳞状细胞癌的铁死亡可对其发挥肿瘤抑制作用^[17]。诱导铁死亡可刺激肿瘤免疫反应,促进肿瘤细胞的免疫原性死亡,进而增强 5-氨基亮氨酸光动力学疗法对 cSCC 的抗癌作用^[18]。Nrf2 作为一种氧化还原敏感性转录因子,可通过调控氧化还原平衡蛋白 GPX4 和 SLC7A11 表达而介导胶质母细胞瘤、非小细胞肺癌、食管鳞状细胞癌等肿瘤细胞的铁死亡过程^[6-8]。诱导 SLC7A11 表达可维持细胞内 GSH 稳态,克服索拉非尼诱导的肝癌细胞铁死亡,进而引发肝癌的索拉非尼耐药性^[19]。激活 Nrf2 信号可上调 SLC7A11 和 GPX4 表达,从而抑制鼻咽癌细胞铁死亡,敲除 GPX4 基因可通过增强铁死亡抑制鼻咽癌细胞的增殖和集落形成^[20]。王敏等^[16]的研究显示,鸦胆子苦醇可抑制非小细胞肺癌 Nrf2 信号和细胞生长,因而推测鸦胆子苦醇可能通过抑制 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号激活而促进 cSCC 铁死亡。本文结果显示,以 500、700 nmol/L 鸦胆子苦醇处理 A431 细胞,可降低细胞 GSH 及 CAT、SOD 水平,Nrf2 及 SLC7A11、GPX4 蛋白表达,升高细胞铁含量和 ROS 及 MDA 水平,表明鸦胆子苦醇可抑制 cSCC 铁死亡,Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号介导该过程。以 Nrf2 激活剂 TBHQ 处理 A431 细胞,可上调 SLC7A11、GPX4 蛋白表达,抑制细胞凋亡及铁死亡。以 TBHQ 和鸦胆子苦醇联合处理 A431 细胞相比鸦胆子苦醇单独处理,可升高细胞增殖率,GSH 及 CAT、SOD 水平,PCNA 及 Bcl-2、Nrf2、SLC7A11、

GPX4 蛋白表达,降低细胞凋亡率、铁含量、ROS 及 MDA 水平和 Bax 蛋白表达,表明 TBHQ 可减弱鸦胆子苦醇对 A431 细胞活性氧产生和铁累积的增强作用,拮抗其对 A431 细胞脂质过氧化和铁死亡的促进作用,最终逆转其抗增殖和促凋亡作用,表明鸦胆子苦醇促进 cSCC 细胞铁死亡是通过抑制 Nrf2 信号通路激活实现的。

总之,本文证实了鸦胆子苦醇可下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路蛋白表达,进而减弱抗氧化因子活性,引发活性氧大量产生和铁累积,诱导脂质过氧化和铁死亡,促进 cSCC 细胞凋亡,并抑制其增殖,对 cSCC 起到明显的抗癌作用。激活 Nrf2 信号可减弱鸦胆子苦醇 cSCC 的抗癌功效及对 cSCC 铁死亡的促进作用。下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路可能是其药理机制之一。本文为 cSCC 的治疗提供了鸦胆子苦醇这一新型候选药物,并为其临床推广应用提供了理论资料,有利于 cSCC 治疗方法的开发改进。鸦胆子苦醇下调 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路及其下游的具体分子机制还未深入研究,且本文只进行了体外细胞研究,cSCC 作为发生在人体皮肤表面的癌症,还需进行体内动物实验,需要更深入地探讨。

参 考 文 献

- [1] de Jong E, Lammerts MUPA, Genders RE, et al. Update of advanced cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2022, 36(Suppl 1): 6–10.
- [2] Hughes BGM, Munoz-Couselo E, Mortier L, et al. Pembrolizumab for locally advanced and recurrent/metastatic cutaneous squamous cell carcinoma (KEYNOTE-629 study): an open-label, nonrandomized, multicenter, phase II trial[J]. Ann Oncol, 2021, 32(10): 1276–1285.
- [3] Yan F, Tillman BN, Nijhawan RI, et al. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinical review[J]. Ann Surg Oncol, 2021, 28(13): 9009–9030.
- [4] Fujihara KM, Zhang BZ, Clemons NJ. Opportunities for ferroptosis in cancer therapy[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(6): 986.
- [5] Xu CC, Zhuo YT, Liu YY, et al. Itraconazole inhibits the growth of cutaneous squamous cell carcinoma by targeting HMGCS1/ACSL4 axis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 828983.
- [6] Gao XC, Guo N, Xu H, et al. Ibuprofen induces ferroptosis of glioblastoma cells via downregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling pathway[J]. Anticancer Drugs, 2020, 31(1): 27–34.
- [7] Tang X, Ding H, Liang ML, et al. Curcumin induces ferroptosis in non-small-cell lung cancer via activating autophagy[J]. Thorac Cancer, 2021, 12(8): 1219–1230.
- [8] Feng L, Zhao KK, Sun LC, et al. SLC7A11 regulated by Nrf2 modulates esophageal squamous cell carcinoma radiosensitivity by inhibiting ferroptosis[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 367.
- [9] Lee JH, Rangappa S, Mohan CD, et al. Brusatol, a Nrf2 inhibitor targets STAT3 signaling cascade in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 550.
- [10] 刘思园,蔡 萌,李春建,等. 鸦胆子苦醇抑制结直肠癌细胞增殖与 Nrf2 通路相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(4): 243–249, 257.
- [11] Liu SY, Cai M, Li CJ, et al. Inhibitory effects of Brusatol on proliferation and Nrf2 pathway in colorectal cancer cells[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2018, 25(4): 243–249, 257.
- [12] 何 爽,杜玉梅,唐加峰,等. 鸦胆子苦醇抑制 H1299 非小细胞肺癌细胞增殖和促进其凋亡的机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 360–366.
- [13] He S, Du YM, Tang JF, et al. Research of proliferation inhibition and apoptosis promotion mechanism of brusatol on H1299 cells[J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(3): 360–366.
- [14] Zhou B, Zhang XL, Wang GR, et al. Drug screening assay based on the interaction of intact Keap1 and Nrf2 proteins in cancer cells[J]. Bioorg Med Chem, 2019, 27(1): 92–99.
- [15] Ferrarotto R, Amit M, Nagarajan P, et al. Pilot phase II trial of neoadjuvant immunotherapy in locoregionally advanced, resectable cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(16): 4557–4565.
- [16] Hedberg ML, Berry CT, Moshiri AS, et al. Molecular mechanisms of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3478.
- [17] 卢睿瑾,杜玉梅,黄世莹,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.
- [18] Lu RJ, Du YM, Huang SY, et al. Brusatol inhibits migration and invasion of colorectal cancer HCT-116 cells via suppressing RhoA/ROCK1 signaling pathway[J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(10): 1360–1365.
- [19] 王 敏,刘其礼,许 帅,等. 鸦胆子苦醇对非小细胞肺癌 Nrf2-Notch1 信号轴的影响机制研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(19): 16–19.
- [20] Wang M, Liu QL, Xu S, et al. Study on the mechanism of the influence of Brusatol for the Nrf2-Notch1 axis of non-small cell lung cancer[J]. China Med Her, 2018, 15(19): 16–19.
- [21] Jiang B, Zhao YQ, Shi M, et al. DNAJB6 promotes ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(7): 1999–2008.
- [22] Zeng QY, Yang JY, Ji J, et al. PD-L1 blockade potentiates the antitumor effects of ALA-PDT and optimizes the tumor microenvironment in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Oncoimmunology, 2022, 11(1): 2061396.
- [23] Gao RZ, Kalathur RKR, Coto-Llerena M, et al. YAP/TAZ and ATF4 drive resistance to Sorafenib in hepatocellular carcinoma by preventing ferroptosis[J]. EMBO Mol Med, 2021, 13(12): e14351.
- [24] Yuan L, Li SB, Chen QY, et al. EBV infection-induced GPX4 promotes chemoresistance and tumor progression in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(8): 1513–1527.

(责任编辑:唐秋姗)