## 锦灯笼醇提取物调控SLC7A11/ALOX12通路 对乳腺癌细胞铁死亡的影响

孙承阳1 袁诗博1 王运良2\* 吕田旭3 暴大林4 孙红梅5

(<sup>1</sup>佳木斯市结核病医院(佳木斯市肿瘤医院),临床试验机构办公室,佳木斯154007;<sup>2</sup>佳木斯市结核病医院(佳木斯市肿瘤医院), 伦理审查委员会,佳木斯154007;<sup>3</sup>哈尔滨医科大学第二临床医学院,哈尔滨150000;<sup>4</sup>佳木斯大学,药学系,佳木斯154003; <sup>5</sup>佳木斯市结核病医院(佳木斯市肿瘤医院),肿瘤科,佳木斯154007)

摘要 该研究旨在探究锦灯笼(PCF)醇提取物通过溶质载体家族7成员11(SLC7A11)/ALOX12 通路对乳腺癌细胞铁死亡的影响。该研究选择乳腺癌MCF-7细胞系并将其分为5组:对照组、PCF 低浓度组、PCF 南浓度组、PCF 高浓度组、PCF 高浓度+激活剂组。分别进行EdU检测、脂质过氧化检测、铁测定、谷胱甘肽(GSH)含量测定实验;并用qRT-PCR检测细胞中SLC7A11、ALOX12 mRNA表达; Western blot检测细胞中SLC7A11、ALOX12蛋白表达情况。结果显示,与对照组相比, PCF低、中、高浓度组MCF-7细胞EdU阳性率, GSH含量, SLC7A11 mRNA及其蛋白表达水平均降低, 脂质过氧化程度、亚铁和总铁离子含量、ALOX12 mRNA及其蛋白表达水平升高(P<0.05), 且PCF 醇提取物对MCF-7细胞的影响随浓度提高而增强(P<0.05)。与PCF高浓度组相比, PCF高浓度+激活剂 组细胞EdU阳性率、GSH含量、SLC7A11 mRNA及其蛋白表达水平升高, 脂质过氧化程度、亚铁和总铁离子含量、ALOX12 mRNA及其蛋白表达水平升高, 脂质过氧化程度、亚钠和总铁离子含量、ALOX12 mRNA及其蛋白表达水平升高, 脂质过氧化程度、亚钠和总铁离子含量、ALOX12 mRNA及其蛋白表达水平升高, 脂质过氧化程度、亚铁

关键词 锦灯笼醇提取物;溶质载体家族7成员11/ALOX12通路;乳腺癌细胞;铁死亡

## Effect of Physalis Calyx Seu Fructus Alcoholic Extract on Ferroptosis of Breast Cancer Cells by Regulating SLC7A11/ALOX12 Pathway

SUN Chengyang<sup>1</sup>, YUAN Shibo<sup>1</sup>, WANG Yunliang<sup>2\*</sup>, LÜ Tianxu<sup>3</sup>, BAO Dalin<sup>4</sup>, SUN Hongmei<sup>5</sup>

(<sup>1</sup>Office of GCP, Jiamusi Tuberculosis Hospital (Jiamusi Cancer Hospital), Jiamusi 154007, China; <sup>2</sup>Ethics Review Committee, Jiamusi Tuberculosis Hospital (Jiamusi Cancer Hospital), Jiamusi 154007, China; <sup>3</sup>Second Clinical Medical College, Harbin Medical University, Harbin 150000, China; <sup>4</sup>College of Pharmacy Jiamusi University, Jiamusi 154003, China; <sup>5</sup>Department of Oncology, Jiamusi Tuberculosis Hospital (Jiamusi Cancer Hospital), Jiamusi 154007, China)

**Abstract** This study aimed to explore the effect of PCF (physalis calyx seu fructus) alcohol extract on ferroptosis of breast cancer cells through the SLC7A11 (solute carrier family 7 member 11)/ALOX12 pathway. This study selected breast cancer MCF-7 cell lines and assigned into five groups: control group, low concentration PCF group, medium concentration PCF group, high concentration PCF group, high concentration PCF group. EdU detection, lipid peroxidation detection, iron determination, and GSH (glutathione) content determination ex-

收稿日期: 2024-12-05 接受日期: 2025-01-13

佳木斯市市级科技计划创新激励类项目(批准号: SF20235L0001)资助的课题

<sup>\*</sup>通信作者。Tel: 13604547917, E-mail: 13704540727@163.com

Received: December 5, 2024 Accepted: January 13, 2025

This work was supported by the Jianusi Municipal Science and Technology Plan Innovation Incentive Project (Grant No.SF20235L0001)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-13604547917, E-mail: 13704540727@163.com

periments were conducted; qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of *SLC7A11* and *ALOX12* in cells. In addition, Western blot was used to detect the expression of SLC7A11 and ALOX12 proteins in cells. The results showed that compared with the control group, the EdU positive rate, GSH content, SLC7A11 mRNA and protein expression in MCF-7 cells were reduced in the low, medium, and high concentration PCF groups, the degree of lip-id peroxidation, ferrous and total iron ion contents, ALOX12 mRNA and protein expression were elevated (P<0.05), and the effect of PCF alcohol extract on MCF-7 cells increased with increasing concentration (P<0.05). Compared with the high concentration PCF group, the EdU positive rate, GSH content, SLC7A11 mRNA and protein expression in MCF-7 cells were raised in the high concentration PCF+activator group, the degree of lipid peroxidation, ferrous and total iron ion contents, ALOX12 mRNA and protein expression were reduced (P<0.05). The addition of ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 reversed the effect of PCF ethanol extract on ferroptosis of breast cancer cells (P<0.05). PCF ethanol extract may promote ferroptosis of breast cancer cells by regulating SLC7A11/ALOX12 pathway.

**Keywords** physalis calyx seu fructus alcohol extract; solute carrier family 7 member 11/ALOX12 pathway; breast cancer cells; ferroptosis

乳腺癌是女性癌症中死亡率第五高的疾病,死 亡率高达6.6%<sup>[1]</sup>。乳腺癌分为几种亚型,包括管腔A 型、管腔B型、HER-2过表达型和三阴性乳腺癌四 种分子型[2]。近年来,乳腺癌的治疗包括精细化手术 切除、化疗、放疗、靶向治疗和内分泌治疗。然而, 乳腺癌患者的生存率仍然不容乐观<sup>[3]</sup>。因此,迫切需 要进行广泛研究来设计和开发针对乳腺癌患者的新 型有效治疗策略。铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖 性的非凋亡性细胞死亡,伴有线粒体的改变,主要是 由于过度的脂质过氧化导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累增加所致。铁死亡与癌症的发生 和发展密切相关,并有助于包括乳腺癌在内的各种 癌症的治疗反应,诱导铁死亡以消除癌细胞是一种 有前景的乳腺癌治疗方法<sup>[4]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)将还原的谷胱甘肽 (glutathione, GSH)转化为氧化型谷胱甘肽(glutathione oxidized, GSSG), 并由于反应中存在ROS而减少 过量的氧化脂质, GSH耗竭可提高基于ROS的疗法、 铁死亡疗法和化疗的治疗效果已被证明<sup>[5]</sup>。溶质 载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)作为抗铁死亡标记物,可通过产生GSH来 调节GPX4活性,负向调控铁死亡<sup>[6]</sup>。花生四烯酸12-脂氧合酶(arachidonic acid 12-lipoxygenase, ALOX12) 基因编码花生四烯酸12-脂氧合酶,其特异性地催化 分子氧添加到花生四烯酸中以产生具有生物活性的 脂质介质,例如12-羟基二十碳四烯酸,在线粒体外 膜中的表达水平增加,主要诱导铁死亡过程中的磷 脂过氧化,已有研究表明,ALOX12表达量增加促进

线粒体脂质过氧化和铁死亡<sup>[7]</sup>。机制上,SLC7A11 抑制ALOX12的脂氧合酶活性,从而减轻含多不饱 和脂肪酸的磷脂过氧化,最终拮抗铁死亡并促进肿 瘤进展<sup>[8]</sup>。锦灯笼(physalis calyx seu fructus, PCF)是 茄科植物锦灯笼的干燥花萼或带果实的花萼,未被 大规模开发,主要有抗炎、抗菌、抗氧化、降血糖、 镇痛、抗肿瘤和免疫调节等作用<sup>[9]</sup>。基于此,本研究 旨在探究PCF醇提取物对乳腺癌细胞铁死亡的影响, 以了解PCF的抗癌效果和作用机制。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验材料

MCF-7(人乳腺癌细胞,货号: SNL-060)购自武 汉尚恩生物技术有限公司。

### 1.2 主要试剂

铁死亡抑制剂Ferrostatin-1购自美国 MedChemexpress公司;PCF醇提取物购自成都普 思生物科技股份有限公司;5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU,货号:GJ02505)购自晶抗生物工程有限公司; Click-iT EdU细胞增殖成像试剂盒、BCA试剂盒、 RIPA细胞裂解液、ECL试剂购自美国ThermoFisher Scientific公司;脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11)购自上海碧云天生物技术有限公司; 亚铁离子比色法测试盒(货号:E-BC-K773-M)、总 铁离子比色法测试盒(货号:E-BC-K772-M)购自武 汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;总谷胱甘肽 (T-GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)测定试剂盒(货号: A061-1-1)购自南京建成生物工程研究所;RNA快速 提取试剂盒(货号:AG21023)购自湖南艾科瑞生物 工程有限公司;逆转录试剂盒购自南京诺唯赞生物 科技股份有限公司;2× HQ SYBR qPCR Mix(High ROX)购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; SLC7A11单克隆抗体(货号:ab307601)、ALOX12单 克隆抗体(货号:ab168384)、GAPDH单克隆抗体(货 号:ab128915)、羊抗兔IgG二抗(货号:ab205718)均 购自美国Abcam公司。

#### 1.3 细胞分组

将MCF-7细胞分为对照组、PCF低浓度组、 PCF中浓度组、PCF高浓度组、PCF高浓度+激活剂组, PCF低、中、高浓度组分别采用2.5 µg/mL、5 µg/mL 和10 µg/mL PCF醇提取物处理<sup>[10]</sup>, PCF高浓度+激活 剂组采用10 µg/mL PCF和2 µmol/L Ferrostatin-1共 同处理以激活 SLC7A11表达<sup>[11]</sup>,各组细胞药物处理 48 h。

#### 1.4 EdU检测细胞增殖

将MCF-7细胞接种到培养皿中,分组处理,培养 48 h后,根据Click-iT EdU细胞增殖成像试剂盒的说 明书步骤对细胞进行染色,将细胞与DAPI溶液一起 室温孵育5 min,并使用荧光显微镜观察。

## 1.5 脂质过氧化检测

将细胞接种在6孔板中,每组进行6个重复,分组培养48h后,吸除培养液,加入1mL BODIPY 581/591 C11染色工作液,然后在细胞培养箱中37°C孵育 10~30min,孵育结束后,吸除上清,用PBS洗涤2次。 加入2mL PBS,共聚焦显微镜下观察。

## 1.6 铁测定

铁水平的变化是识别铁死亡的关键生物标志物。使用铁测定试剂盒分别测量细胞内总铁和亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)含量。用细胞刮刀收集细胞,并将0.2 mL缓冲液裂解物添加到每组约1×10<sup>6</sup>个细胞中,并均匀混合,在冰上孵育10 min,室温下12 000 ×g离心10 min,然后按照试剂盒说明对上清液进行测量。总铁待测样品在37 °C下孵育40 min,而亚铁含量待测样品在37 °C下孵育10 min,用酶标仪测量593 nm处的吸光度(D)值,计算总铁及亚铁离子含量。

## 1.7 GSH含量测定

收集每个处理组的细胞并将其裂解,确保细胞 沉淀在显微镜下不可见。然后将混合物在4°C下以 10000×g离心10min,收集上清液并保存在冰上以备 进一步分析。使用试剂盒法测定T-GSH含量,其中 使用酶标仪在412 nm处测量每个孔的吸光度(D)值。 随后,通过在进行样品反应之前去除GSH并用微孔 板读数仪再次测量412 nm处的吸光度(D)值来测定 GSSG含量。GSH含量计算为T-GSH含量减去2倍的 GSSG含量。

## 1.8 qRT-PCR检测SLC7A11、ALOX12 mRNA表达

使用细胞RNA快速提取试剂盒提取总RNA, 用逆转录试剂盒(含热敏双链DNase)将其逆转录为 cDNA, 2× HQ SYBR qPCR Mix进行引物验证和目的 基因扩增,反应条件为95°C预变性30s; 95°C变性 10s, 60°C退火延伸30s, 40个循环,以*GAPDH*为内 参,使用2<sup>-AACt</sup>方法计算*SLC7A11*和*ALOX12*的mRNA 表达量。引物序列*SLC7A11*正向:5'-CTA ACT AAC TGG TCC TCA ACT C-3'; *SLC7A11*反向:5'-CCT AAG AAA CAA CGC AAT CC-3'; *GAPDH*正向:5'-AAT CCC ATC ACC ATC TTC-3'; *GAPDH*反向:5'-AGG CTG TTG TCA TAC TTC-3'; *ALOX12*正向:5'-GCT CCT GGA ACT GCC TAG AA-3'; *ALOX12*反向: 5'-TCA TCA TCC TGC CAG CAC T-3'。

# **1.9** Western blot检测 SLC7A11、ALOX12蛋白 表达情况

使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA细胞裂解液提取各组细胞蛋白,用BCA试剂盒 测定总蛋白浓度,以1 µg/µL为标准在加样前对不同 给药浓度下的细胞蛋白浓度进行相对定量。12% SDS PAGE凝胶电泳后分离总蛋白并将其转移到硝 酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉4 °C封闭1h,洗涤后, 印迹膜与GAPDH、SLC7A11、ALOX12特异性一 抗稀释液[GAPDH(1:20 000)、SLC7A11(1:1 000)、 ALOX12(1:1 000)]在4 °C孵育过夜,与HRP标记的 IgG二抗(1:50 000)室温共孵育1h。ECL试剂显色, ImageJ软件评估灰度值。

## 1.10 统计分析

Graphpad Prism 7.0软件用于分析数据。数据 表示为平均值±标准差(x±s)。多组间比较采用单因 素方差分析,两组间比较采用SNK-q检验, P<0.05表 示差异具有统计学意义。

#### 2 结果

## 2.1 各组细胞增殖能力比较

与对照组比较, PCF低、中、高浓度组 MCF-7

的EdU阳性率降低(P<0.05),且浓度越高,降低幅度 越大(P<0.05);与PCF高浓度组比较,PCF高浓度+激 活剂组MCF-7细胞的EdU阳性率提高(P<0.05),见图 1、图2和表1。

#### 2.2 各组MCF-7细胞脂质过氧化程度比较

与对照组比较, PCF低、中、高浓度组MCF-7 细胞脂质过氧化程度提高(P<0.05); 且随PCF浓度 增加逐渐提高(P<0.05); 与PCF高浓度组比较, PCF 高浓度+激活剂组MCF-7细胞脂质过氧化程度降低 (P<0.05), 见图3、图4和表2。

#### 2.3 各组MCF-7细胞亚铁和总铁离子含量比较

与对照组比较, PCF低、中、高浓度组MCF-7 细胞Fe<sup>2+</sup>和总铁离子含量均升高(P<0.05); 且随浓度 增加不断升高(P<0.05); 与PCF高浓度组比较, PCF 高浓度+激活剂组MCF-7细胞Fe<sup>2+</sup>和总铁离子含量降 低(P<0.05), 见图5与表3。

#### 2.4 各组MCF-7细胞GSH含量比较

与对照组比较, PCF低、中、高浓度组 MCF-7



图1 EdU检测各组MCF-7细胞增殖情况 Fig.1 EdU detection of MCF-7 cell proliferation in each group



\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group.

> 图2 各组MCF-7细胞EdU阳性率 Fig.2 EdU positive rate of MCF-7 cells in each group

Table 1 Comparison of EdU positive rates of MCF-7 cells in each group		
组别	EdU阳性率/%	
Groups	EdU positive rate /%	
Control	58.25±5.93	
L-PCF	49.83±5.04*	
M-PCF	38.74±3.98* <sup>#</sup>	
H-PCF	25.21±2.65***&	
H-PCF+activator	47.92±4.87 <sup>@</sup>	
F	44.319	
Р	0.000	

	表1	各组MCF-7细胞EdU阳性率比较
abla 1	Compania	of Edil positive votes of MCE 7 colls in each group

\*P<0.05,与对照组比较;\*P<0.05,与PCF低浓度组比较;\*P<0.05,与PCF中浓度组比较; @P<0.05,与PCF高浓度组比较。n=6。

\*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; \*P<0.05 compared with the H-PCF group. n=6.



图3 各组MCF-7细胞脂质过氧化程度 Fig.3 Lipid peroxidation degree of MCF-7 cells in each group



\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group.

> 图4 各组MCF-7细胞脂质过氧化程度 Fig.4 Lipid peroxidation degree of MCF-7 cells in each group

Table 2 Comparison of npid peroxidation degree of MCF-7 cens in each group			
组别	脂质过氧化程度		
Groups	The degree of lipid peroxidation		
Control	1.03±0.11		
L-PCF	0.87±0.11*		
M-PCF	$0.65{\pm}0.07^{*\#}$		
H-PCF	0.43±0.06* <sup>#&amp;</sup>		
H-PCF+activator	$0.91 \pm 0.11^{@}$		
F	37.982		
Р	0.000		

#### 表2 各组MCF-7细胞脂质过氧化程度比较 able 2 Comparison of linid peroxidation degree of MCF-7 cells in each group

\*P<0.05,与对照组比较; \*P<0.05,与PCF低浓度组比较; \*P<0.05,与PCF中浓度组比较; @P<0.05,与PCF高浓度组比较。n=6。

\*P<0.05 compared with the control group; "P<0.05 compared with the L-PCF group; "P<0.05 compared with the M-PCF group; "P<0.05 compared with the H-PCF group, n=6.



\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group.

#### 图5 各组MCF-7细胞亚铁和总铁离子含量

#### Fig.5 Contents of ferrous iron and total iron ions in MCF-7 cells in each group

Table 3 Comparison of ferrous iron and total iron ion contents in MCF-7 cells in each group		
组别	亚铁离子含量/nmol/10 <sup>6</sup>	总铁离子含量/nmol/10 <sup>6</sup>
Groups	$\mathrm{Fe}^{2+}/\mathrm{nmol}/10^{6}$	Fe /nmol/10 <sup>6</sup>
Control	0.36±0.05	$0.67{\pm}0.08$
L-PCF	1.13±0.13*	1.42±0.16*
M-PCF	2.24±0.25* <sup>#</sup>	2.47±0.27* <sup>#</sup>
H-PCF	3.42±0.36* <sup>#&amp;</sup>	3.56±0.38* <sup>#&amp;</sup>
H-PCF+activator	$1.02{\pm}0.12^{@}$	$1.14{\pm}0.14^{@}$
F	192.932	150.331
Р	0.000	0.000

	表3	各组MCF-7细胞亚铁和总铁离子含量比较
Commente	. f f.	mens ince and total ince ice contents in MCE 7 cells in each.

\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。n=6。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group. n=6.

细胞GSH含量随浓度升高逐渐降低(P<0.05);与PCF 高浓度组比较,PCF高浓度+激活剂组MCF-7细胞 GSH含量增加(P<0.05),见图6与表4。

# 2.5 各组MCF-7细胞中*SLC7A11、ALOX12* mRNA 表达比较

与对照组比较, PCF低、中、高浓度组MCF-7



\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group.

## 图6 各组MCF-7细胞GSH含量

### Fig.6 GSH content of MCF-7 cells in each group

Table 4 Comparison of GSH content in MCF-7 cells in each group		
组别	GSH含量/µmol/10 <sup>3</sup>	
Groups	GSH /µmol/10 <sup>3</sup>	
Control	5.31±0.56	
L-PCF	4.53±0.51*	
M-PCF	3.24±0.38* <sup>#</sup>	
H-PCF	1.82±0.22* <sup>#&amp;</sup>	
H-PCF+activator	$4.78 \pm 0.52^{@}$	
F	57.249	
Р	0.000	

#### 表4 各组MCF-7细胞GSH含量比较 ble 4 Comparison of GSH content in MCF-7 cells in each grou

\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 n=6。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group. n=6.

中的*SLC7A11* mRNA表达水平降低, *ALOX12* mRNA 表达水平升高(P<0.05);且PCF浓度越高, *SLC7A11* 和*ALOX12* mRNA水平变化幅度越大(P<0.05);与 PCF高浓度组比较,PCF高浓度+激活剂组MCF-7中 的*SLC7A11* mRNA表达水平升高, *ALOX12* mRNA表 达水平降低(P<0.05),见图7与表5。

## 2.6 各组MCF-7细胞中SLC7A11、ALOX12蛋白 表达比较

与对照组比较, PCF低、中、高浓度组 MCF-7 中的 SLC7A11蛋白表达水平降低, ALOX12蛋白表 达水平升高(P<0.05); 且 PCF浓度越高, SLC7A11和 ALOX12蛋白表达变化幅度越大(P<0.05); 与 PCF 高浓度组比较, PCF高浓度+激活剂组MCF-7中的 SLC7A11蛋白表达水平提高, ALOX12蛋白表达水 平降低(P<0.05), 见图8、图9和表6。

## 3 讨论

乳腺癌是目前世界上最常见的癌症。最新的全 球癌症负担数字估计,2020年有226万乳腺癌病例,该 疾病是全球妇女癌症死亡的主要原因<sup>[12]</sup>。癌细胞处 于持续的代谢紊乱状态,例如由铁离子和硫醇的氧 化还原反应引起的氧化应激,因此比正常细胞更容 易逃避铁死亡<sup>[13]</sup>。正常乳腺上皮细胞缺乏α6β4整合 素,由于GPX4抑制而使细胞易发生铁死亡,然而乳腺



\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group.



### 表5 MCF-7细胞中SLC7A11、ALOX12的mRNA表达比较 Table 5 Comparison of SLC7A11, ALOX12 mRNA expression in MCF-7 cells

组别	SI C7 All	ALOX12
Groups	SEC/AII	
Control	1.05±0.11	1.03±0.11
L-PCF	0.87±0.09*	1.44±0.16*
M-PCF	$0.72 \pm .09^{*\#}$	1.97±0.21* <sup>#</sup>
H-PCF	0.35±0.05* <sup>#&amp;</sup>	2.56±0.27* <sup>#&amp;</sup>
H-PCF+activator	0.91±0.10 <sup>@</sup>	1.38±0.15 <sup>@</sup>
F	52.647	60.462
Р	0.000	0.000

\*P<0.05,与对照组比较; \*P<0.05,与PCF低浓度组比较; \*P<0.05,与PCF中浓度组比较; @P<0.05,与PCF高浓度组比较。n=6。

\*P<0.05 compared with the control group; "P<0.05 compared with the L-PCF group; "P<0.05 compared with the M-PCF group; "P<0.05 compared with the H-PCF group. n=6.



A: 对照组; B: PCF低浓度组; C: PCF中浓度组; D: PCF高浓度组; E: PCF高浓度+激活剂组。

A: control group; B: L-PCF group; C: M-PCF group; D: H-PCF group; E: H-PCF+activator group.

图8 Western blot检测MCF-7细胞中SLC7A11/ALOX12的蛋白表达情况

Fig.8 Western blot detection of protein expression of SLC7A11/ALOX12 in MCF-7 cells

癌细胞表达α6β4整合素,保护它们免于铁死亡<sup>[14]</sup>。铁 死亡是独特的非凋亡形式的细胞死亡,其特征是细 胞内铁积聚、ROS增加和脂质过氧化以及氧化和抗 氧化系统之间的失衡。研究已经证实,铁死亡在癌 症进展中起着关键作用,并且引发铁死亡可能是抗 癌治疗和减轻癌细胞化疗耐药性的可行方法<sup>[15]</sup>。



\*P<0.05, 与对照组比较; \*P<0.05, 与PCF低浓度组比较; \*P<0.05, 与PCF中浓度组比较; @P<0.05, 与PCF高浓度组比较。 \*P<0.05 compared with the control group; \*P<0.05 compared with the L-PCF group; \*P<0.05 compared with the M-PCF group; @P<0.05 compared with the H-PCF group.

## 图9 MCF-7细胞中SLC7A11、ALOX12相对蛋白表达量 Fig.9 Relative protein expression of SLC7A11, ALOX12 in MCF-7 cells

Table 0 Comparison of SECTATT and ALOAT2 protein expression in MCT-7 cens in each group			
组别	SI C7A11	ALOX12	
Groups	SEC/AII	ALOAIZ	
Control	1.06±0.11	0.43±0.05	
L-PCF	0.89±0.09*	0.56±0.07*	
M-PCF	$0.64{\pm}0.07^{*\#}$	0.84±0.11* <sup>#</sup>	
H-PCF	0.31±0.04* <sup>#&amp;</sup>	1.31±0.14* <sup>#&amp;</sup>	
H-PCF+activator	0.92±0.11@	0.52±0.06@	
F	67.523	89.838	
Р	0.000	0.000	

#### 表6 各组MCF-7细胞中SLC7A11、ALOX12蛋白表达比较 Table 6 Comparison of SLC7A11 and ALOX12 protein expression in MCF-7 cells in each group

\*P<0.05,与对照组比较; \*P<0.05,与PCF低浓度组比较; \*P<0.05,与PCF中浓度组比较; ®P<0.05,与PCF高浓度组比较。n=6。

\*P<0.05 compared with the control group; "P<0.05 compared with the L-PCF group; "P<0.05 compared with the M-PCF group; "P<0.05 compared with the H-PCF group; "P<0.05 compared with the H-PCF

PCF中的类固醇对HeLa(人宫颈癌)、SMMC-7721(人肝癌)和HL-60(人肝癌)细胞系具有较强的 细胞毒性。PCF中的酸浆苦味素通过抑制 STAT3信 号通路诱导下游靶基因表达,促进多发性骨髓瘤细 胞凋亡;酸浆苦味素A通过激活死亡受体相关的外 源性凋亡通路,上调caspase-3和caspase-8的表达,选 择性诱导人纤维肉瘤HT1080细胞凋亡,对正常细 胞无生长抑制作用<sup>[16]</sup>。本研究通过PCF醇提取物对 MCF-7细胞铁死亡的影响来研究其对乳腺癌的治疗 作用。EdU结果显示, PCF醇提取物处理的MCF-7细 胞增殖能力降低;脂质过氧化测定显示,PCF醇提取 物提高了MCF-7的脂质过氧化程度。铁是脂质过氧 化物积累和铁死亡所必需的, PCF醇提取物处理后, MCF-7中Fe<sup>2+</sup>和总Fe含量随浓度增加而显著增加,且 GSH含量降低。上述结果均表明, PCF醇提取物可 以促进MCF-7细胞的铁死亡。

铁死亡的细胞死亡是由铁的积累、脂质ROS和 丙二醛水平升高以及GSH水平降低引起的<sup>[17]</sup>。通过 胱氨酸/谷氨酸转运系统(SLC7A11和SLC3A2), 细胞 从细胞外环境中吸收胱氨酸,内部合成GSH,GPX4 利用GSH补充将过氧化脂质转化为无害的脂醇,以抵 御铁死亡<sup>[18]</sup>。研究证明p53-ALOX12可以促进GSH 独立的铁死亡<sup>[19]</sup>。ALOX12为p53依赖性铁死亡的 关键调节剂,其可通过自由氧化细胞膜磷脂中的多 不饱和脂肪酸链导致细胞铁死亡<sup>[20]</sup>。SBFI26可能通 过TP53-SAT1-ALOX信号通路诱导铁死亡<sup>[21]</sup>。因此, 本研究采用 gRT-PCR和 Western blot检测 SLC7A11、 ALOX12 mRNA和蛋白表达,结果显示, PCF各处理 组MCF-7中SLC7A11表达水平降低, ALOX12表达 水平升高;表明PCF醇提取物能够诱导乳腺癌细胞 中的铁死亡。与PCF高浓度组相比, PCF高浓度+激 活剂组SLC7A11表达被激活,ALOX12的表达被抑 制,细胞增殖能力提高,铁死亡被抑制,表明铁死亡 抑制剂Ferrostatin-1处理可抑制PCF醇提取物诱导的 MCF-7细胞的铁死亡。

综上所述, PCF醇提取物可能通过抑制 SL-C7A11表达、促进ALOX12表达,进而抑制乳腺癌细 胞增殖,促进铁死亡。SLC7A11/ALOX12可能成为 治疗乳腺癌的靶点。本研究未在体内进行实验,尚 存在不足之处,后续研究需进行动物实验。

#### 参考文献 (References)

- YANG F, XIAO Y, DING J H, et al. Ferroptosis heterogeneity in triple-negative breast cancer reveals an innovative immunotherapy combination strategy [J]. Cell Metab, 2023, 35(1): 84-100.
- [2] TSANG J Y S, TSE G M. Molecular classification of breast cancer [J]. Adv Anat Pathol, 2020, 27(1): 27-35.
- [3] BARZAMAN K, KARAMI J, ZAREI Z, et al. Breast cancer: biology, biomarkers, and treatments [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84(1): 106535.
- [4] LI J, HE D, LI S, et al. Ferroptosis: the emerging player in remodeling triple-negative breast cancer [J]. Front Immunol, 2023, 14(1): 1284057.
- [5] NIU B, LIAO K, ZHOU Y, et al. Application of glutathione depletion in cancer therapy: enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy [J]. Biomaterials, 2021, 277(1): 121110.
- [6] HE F, ZHANG P, LIU J, et al. ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis [J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 362-77.
- [7] ZHONG C, YANG J, ZHANG Y, et al. TRPM2 mediates hepatic ischemia-reperfusion injury via Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial lipid peroxidation through increasing ALOX12 expression [J]. Research, 2023, 6(1): 0159.
- [8] ZHAI J, MIN J, GONG M. Induction of ferroptosis by brucine suppresses gastric cancer progression through the p53-mediated SLCA711/ALOX12 axis [J]. Heliyon, 2024, 10(13): e33674.
- [9] LIU M, LIU G, MA Z, et al. A comprehensive quality evaluation method of different medicinal parts of physalis calyx seu fructus by fingerprints, chemometrics, antioxidant activity, network pharmacology and molecular docking [J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37(10): e5701.

- [10] 黄余峰,于立江,崔丽华,等. 锦灯笼醇提取物通过IncRNA AK093987基因的表达对结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及 机制研究[J]. 河北医药(HUANG Y F, YU L J, CUI L H, et al. Effects and mechanisms of jinlan lantern alcohol extract on proliferation and apoptosis of colon cancer cells through the expression of lncRNAAK093987 gene [J]. Hebei Medical Journal), 2022, 44(9): 1316-20.
- [11] 李昕, 栗东海, 高小明, 等. 重楼皂苷通过p53/SLC7A11信号轴 促进三阴性乳腺癌细胞铁死亡的机制研究[J]. 解放军医学杂志(LI X, LI D H, GAO X M, et al. Research on the mechanism of Chonglou saponin promoting iron death in triple-negative breast cancer cells through p53/SLC7A11 signaling axis [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army), 2023, 48(1): 58-63.
- [12] WILKINSON L, GATHANI T. Understanding breast cancer as a global health concern [J]. Br J Radiol, 2022, 95(1130): 20211033.
- [13] LI S, ZENG H, FAN J, et al. Glutamine metabolism in breast cancer and possible therapeutic targets [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 210(1): 115464.
- [14] DONG X, LI Y, SHENG X, et al. Mitochondria-related signaling pathways involved in breast cancer regulate ferroptosis [J]. Genes Dis, 2023, 11(1): 358-66.
- [15] LI Q, LIU H, JIN Y, et al. Analysis of a new therapeutic target and construction of a prognostic model for breast cancer based on ferroptosis genes [J]. Comput Biol Med, 2023, 165(1):107370.
- [16] LIU Y, WANG X, LI C, et al. Research progress on the chemical components and pharmacological effects of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino [J]. Heliyon, 2023, 9(12): e20030.
- [17] CHEN X, ZHU J, LI X, et al. ARHGAP6 suppresses breast cancer tumor growth by promoting ferroptosis via RhoA-ROCK1p38 MAPK signaling [J]. Front Biosci, 2024, 29(1): 6.
- [18] CUI Y, LI Y, XU Y, et al. SLC7A11 protects luminal A breast cancer cells against ferroptosis induced by CDK4/6 inhibitors [J]. Redox Biol, 2024, 76(1): 103304.
- [19] LIU Y, GU W. p53 in ferroptosis regulation: the new weapon for the old guardian [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(5): 895-910.
- [20] CHU B, KON N, CHEN D, et al. ALOX12 is required for p53mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(5): 579-91.
- [21] HE G, ZHANG Y, FENG Y, et al. SBFI26 induces triple-negative breast cancer cells ferroptosis via lipid peroxidation [J]. J Cell Mol Med, 2024, 28(7): e18212.