DOI: 10.11844/cjcb.2024.12.0003
中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2024, 46(12): 2026–2036 CSTR: 32200.14.cjcb.2024.12.0003

研究论文

金丝桃素诱导乳腺癌细胞铁死亡的作用机制

蒋双艳 向思琦 刘石 崔如霞 彭航 向明钧*
(吉首大学医学院, 湘西苗医小儿推拿医工交叉与转化国家民委重点实验室, 湘西土家族苗族自治州 416000)

摘要 该文旨在探讨金丝桃素诱导乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231铁死亡的作用机制。采用CCK-8法检测不同浓度金丝桃素对MCF-7、MDA-MB-231及MCF-10A细胞活力的影响, 并检测Fer-1(ferrostatin-1)对金丝桃素所影响的细胞活力的恢复作用; 克隆形成实验检测金丝桃素对MCF-7、MDA-MB-231细胞克隆形成的抑制作用; DCFH-DA探针对细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累进行检测; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放检测实验检测LDH的变化情况; 组织铁测定试剂盒对细胞内Fe^{2+}的积累进行检测; 还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒检测GSH水平; 免疫印迹法检测金丝桃素处理后乳腺癌细胞内溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11/xCT)、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)蛋白的表达情况。结果显示, 金丝桃素对乳腺癌细胞MCF-7的半抑制浓度(IC_{50})为10 μmol/L, MDA-MB-231的IC_{50}为15 μmol/L, 且对正常细胞MCF-10A无明显影响。金丝桃素能够导致MCF-7和MDA-MB-231细胞内ROS的积累、LDH的释放。此外, 铁死亡抑制剂Fer-1能够逆转被金丝桃素所影响的MCF-7和MDA-MB-231细胞活力。同时金丝桃素还能够升高MCF-7和MDA-MB-231细胞内Fe^{2+}含量, 降低细胞内GSH水平, 下调xCT以及GPX4的表达。结果表明, 金丝桃素可能通过诱导乳腺癌细胞发生铁死亡从而抑制乳腺癌细胞增殖。

关键词 金丝桃素; 乳腺癌; ROS; 铁死亡

Mechanism of Hypericin Inducing Ferroptosis in Breast Cancer Cells

JIANG Shuangyan, XIANG Siqi, LIU Shi, CUI Ruxia, PENG Hang, XIANG Mingjun*
(*Jishou University School of Medicine, the Key Laboratory of the State Ethnic Affairs Commission of XiangxiMiao Medicine, Pediatric Tuina Medical Intersection and Transformation, Xiangxi Tujia and Miao Autonomous Prefecture 416000, China*)

Abstract This study was aimed to investigate the mechanism of hypericin inducing ferroptosis in breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. CCK-8 assay was used to detect the effects of various concentrations of hypericin on the viability of MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A cells, test the recovery effect of Fer-1 (ferrostatin-1) on the cell viability affected by hypericin. Clonogenic assay was employed to test the inhibitory effect of hypericin on the clonal formation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. DCFH-DA probe was used to detect the accumulation of intracellular ROS (reactive oxygen species). LDH (lactate dehydrogenase) release assay was conducted to measure changes in LDH. Tissue iron assay kit was used to detect the accumulation of intracellular Fe^{2+}. Reduced GSH

收稿日期: 2024-09-27 接受日期: 2024-11-06
湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 22A0354)、湖南省自然科学基金(批准号: 2024JJ7414)和湖南省研究生科研创新项目(批准号: CX20231079)资助的课题
*通信作者。Tel: 0743-8759168, E-mail: xmj688@163.com
Received: September 27, 2024 Accepted: November 6, 2024
This study was supported by the Scientific Research Foundation of Hunan Provincial Education Department of China (Grant No.22A0354), the Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.2024JJ7414), and the Graduate Research Innovation Project of Hunan Province (Grant No.CX20231079)
*Corresponding author. Tel: +86-743-8759168, E-mail: xmj688@163.com

(glutathione) assay kit was employed to measure GSH levels. And immunoblotting was performed to assess the expression of SLC7A11/xCT (solute carrier family 7 member 11) and GPX4 (glutathione peroxidase 4) proteins in breast cancer cells after hypericin treatment. The results showed that hypericin had a semi-inhibitory concentration (IC_{50}) of 10 μmol/L for breast cancer cells MCF-7 and 15 μmol/L for MDA-MB-231 cells, and had no significant effect on normal cells MCF-10A. Hypericin could cause the accumulation of ROS and LDH release in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Additionally, the ferroptosis inhibitor Fer-1 could reverse the impact of hypericin on the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. At the same time, hypericin could also increase the intracellular Fe^{2+} content in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, decrease the levels of GSH, and downregulate the expression of xCT and GPX4. The results indicated that hypericin might inhibit the proliferation of breast cancer cells by inducing ferroptosis.

Keywords hypericin; breast cancer; ROS; ferroptosis

据2022年全球癌症统计数据表明乳腺癌(breast cancer)是全球第二大癌症，占全球癌症发病率的11.6%, 约有230万新发病例, 66.6万死亡病例[1]。1990年至2019年间，我国女性乳腺癌的发病率和死亡率急剧上升[2]。乳腺癌的治疗方法主要包括手术、化疗以及放疗等[3-4]。长期的放疗可能会导致乳腺癌患者面临辐射风险，出现心脏病和血栓栓塞等疾病[5]。辅助治疗和新辅助治疗可以降低乳腺癌死亡率，但仍有数百万计的乳腺癌患者正遭受着癌症治疗的心理和身体副作用[5-6]。从植物中提取的天然化合物因其毒副作用较小, 对人体几乎没有副作用, 在肿瘤防治方面具有独特优势[7]。

铁死亡(ferroptosis)是一种新定义的细胞死亡调节形式, 在形态学、遗传学和生物化学方面与凋亡、坏死和自噬存在明显不同，其特征是铁依赖的脂质过氧化积累, 并参与了多种病理生理条件[8]。铁死亡作为一种特殊的死亡调节方式，其临床应用价值一直备受期待。

金丝桃素(hypericin, HYP)是从传统中药贯叶连翘中提取到的一种萘骈二蒽酮类化合物，是一种天然的单体化合物，具有抗抑郁、抗病毒、抗肿瘤等的生物活性[9]。HYP的3个环近似地处于一个平面，这种扁平的分子结构有利于它与其他生物大分子结合，发挥其活性[10]。与选择性5-羟色胺再摄取抑制剂等传统抗抑郁药相比，HYP的副作用相对较小[11], 可通过多种途径发挥其抗抑郁作用。HYP能够增加细胞外多巴胺、去甲肾上腺素等的浓度，作为突触体制剂，升高突触间隙中神经递质的水平，发挥其抗抑郁的功能[12]。HYP通过抑制连接蛋白43(phosphorylation of connexin 43, Cx43)磷酸化和升高Cx43表达水平，从而修复缝隙连接来发挥抗抑郁作用[13]。HYP对病毒具有广泛的抑制作用。HYP抑制2型登革病毒的RNA合成进而抑制病毒的复制，从而发挥其抗病毒的作用[14]。HYP可通过3-糜蛋白酶样蛋白酶有效抑制猪流行性腹泻病毒和传染性胃肠炎病毒的复制[15]。HYP能够抑制多种癌细胞的生长。HYP除了能够诱导大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生外[16], 还能够增加细胞内氧化应激，降低线粒体膜电位，导致结肠腺癌细胞HT-29死亡[17]。铁死亡抑制剂Lip-1(liproxstatin-1)和Fer-1(ferrostatin-1)均能在一定程度上恢复HYP对MCF-7细胞活力的影响[18]。HYP能够使MCF-7细胞内的谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量显著减少；MDA-MB-231细胞中GSH水平下降20%[19]。而在铁死亡发生的过程中也伴随着细胞内ROS的积累，线粒体膜电位的变化[20]。同时在调控细胞铁死亡的过程中, GSH也发挥了重要作用[20]。因此, 推测HYP或许能够诱导乳腺癌细胞发生铁死亡，从而抑制乳腺癌的生长。本研究以人乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231为研究对象，主要探究HYP是否通过铁死亡这一细胞死亡调节方式诱导乳腺癌细胞死亡及其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

本研究所用人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、MCF-7购自江苏齐氏生物有限公司；人乳腺上皮细胞MCF-10A购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

金丝桃素、Fer-1购自美国MedChemExpress公

司; DMEM培养基购自美国Gibco公司; MCF-10A细胞专用培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清购自杭州天杭生物科技试剂公司; DMSO、0.25%胰蛋白酶购自北京索莱宝生物科技有限公司; 细胞增殖/毒性检测试剂盒(CCK-8法)购自武汉亚科因生物技术有限公司; BCA蛋白定量试剂盒、4%多聚甲醛、0.1%结晶紫购自深圳百凯美生物技术有限公司; 组织铁测定试剂盒(比色法)、还原型GSH测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、Western及IP细胞裂解液、ECL显影液购自上海碧云天生物技术有限公司; 抗体稀释液购自武汉博士德生物工程有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)兔抗购自英国Abcam公司; 溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11/xCT)兔抗购自美国ImmunoWay公司; β-actin鼠抗购自Proteintech公司。

细胞培养箱购自力康生物医疗科技控股有限公司; 台式离心机购自德国Eppendorf公司; 倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司; 酶标仪购自美国Bio-Tek公司; 电泳仪电源、电泳槽购自上海天能生命科学有限公司; 转膜槽购自上海碧云天生物技术有限公司; 化学发光成像仪购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 MDA-MB-231、MCF-7细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养, MCF-10A细胞用MCF-10A细胞专用培养基培养, 细胞均培养在37 °C、5% CO_2的细胞恒温恒湿培养箱。

1.3.2 CCK-8实验 以1×10^{4}个/孔的密度将细胞接种在96孔板上, 细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 分别加入100 μL不同浓度的HYP工作液处理24 h。药物处理完成后, 每孔加入10 μL CCK-8, 37 °C避光孵育, 每隔0.5 h用酶标仪检测一次波长为450 nm处的吸光度(*D*)值。

1.3.3 细胞克隆形成实验 以500个/孔的密度将细胞接种在6孔板上, 细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 分别加入1 mL不同浓度的HYP工作液, 连续培养直至出现单克隆。培养结束后, 1 mL PBS洗3次, 1 mL预冷的4%多聚甲醛室温固定30 min, 1 mL PBS洗3次, 700 μL 0.1%结晶紫室温染色30 min, 1 mL PBS洗3次, 晾干后拍照, 使用ImageJ软件计算单克隆数。

1.3.4 ROS测定 以2×10^{5}个/孔的密度将细胞接种在6孔板上, 细胞贴壁后, 弃去旧培养基; 分别加入1 mL不同浓度的HYP工作液处理24 h, 按照说明书配制好DCFH-DA探针工作液。1 mL PBS洗3次, 加入已配制好的DCFH-DA探针工作液, 37 °C避光孵育30 min。孵育结束后, 弃掉工作液, 1 mL PBS洗3次, 再加入500 μL的PBS以避免细胞死亡影响实验结果。在488 nm激发波长和525 nm发射波长的荧光显微镜下观察并拍照, 使用ImageJ软件计算平均荧光强度。

1.3.5 LDH释放检测 以1×10^{4}个/孔的密度将细胞接种在96孔板上, 细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 分别加入100 μL不同浓度的HYP工作液处理24 h。按说明书处理最大酶活性对照组, 到达测定时间后, 多孔板离心机400 ×*g*室温离心5 min, 取120 μL上清液转移到新的96孔板中, 按照说明书配制工作液, 充分混匀工作液和待测上清, 室温避光孵育30 min, 酶标仪检测波长为490 nm处的吸光度(*D*)值。

1.3.6 细胞内Fe^{2+}的测定 以6×10^{5}个/孔的密度将细胞接种在6孔板上, 细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 分别加入1 mL不同浓度的HYP工作液处理24 h。药物处理完成后收集细胞并计数。向细胞沉淀中加入250 μL裂解液, 于4 °C裂解30 min。按照说明书配制工作液, 充分混匀工作液和待测上清/铁标准品/空白对照。95 °C以上沸水浴5 min, 冷却后3 500 r/min室温离心10 min, 收集上清。每孔取200 μL上清液加入96孔板中, 酶标仪检测波长为520 nm处的吸光度(*D*)值。

1.3.7 细胞内GSH的测定 以6×10^{5}个/孔的密度将细胞接种在6孔板上, 细胞贴壁后, 弃去旧培养基, 分别加入1 mL不同浓度的HYP工作液处理24 h。药物处理完成后收集细胞并计数。向细胞沉淀中加入100 μL裂解液, 于4 °C裂解30 min。向破碎后的细胞悬液中加入100 μL试剂一并混匀, 3 500 r/min室温离心10 min, 取上清。按照说明书向96孔板中加入对应试剂, 轻轻振荡板混匀, 室温静置5 min, 酶标仪检测波长为405 nm处的吸光度(*D*)值。

1.3.8 Western blot检测细胞蛋白表达情况 以2×10^{5}个/孔的密度将细胞接种在6孔板上, 培养24 h细胞贴壁后, 弃去旧培养分别加入1 mL不同浓度的HYP工作液处理24 h。细胞经药物干预处理后, 预冷的1 mL PBS洗3次, 每孔加入100 μL配制好的裂解液, 细胞刮刀刮取细胞收集至1.5 mL离心管内,

冰上裂解30 min。采用BCA法进行蛋白定量, 煮沸使蛋白变性后于–20 °C保存备用。配制SDS-PAGE胶, 点样后, 设置恒定电压为80 V, 电泳20 min, 再将电压调至150 V, 电泳50 min。采用湿转法将蛋白转移至PVDF膜上, 设置恒定电流为200 mA, 转膜时间为90 min。转膜结束, 取出PVDF膜于封闭液中室温封闭15 min。将相对应的条带放入配制好的一抗xCT(1∶1 000)、GPX4(1∶5 000)、β-actin(1∶5 000)中4 °C摇床上孵育过夜。次日用TBST每10 min洗涤1次条带, 重复3次。摇床室温孵育二抗(1∶5 000) 2 h。二抗孵育结束后, 取出条带, 用TBST每10 min洗涤1次条带, 重复3次。按照说明书配制发光液, 在化学成像系统上进行显影。使用ImageJ软件对目的蛋白和内参蛋白(β-actin)进行定量分析。

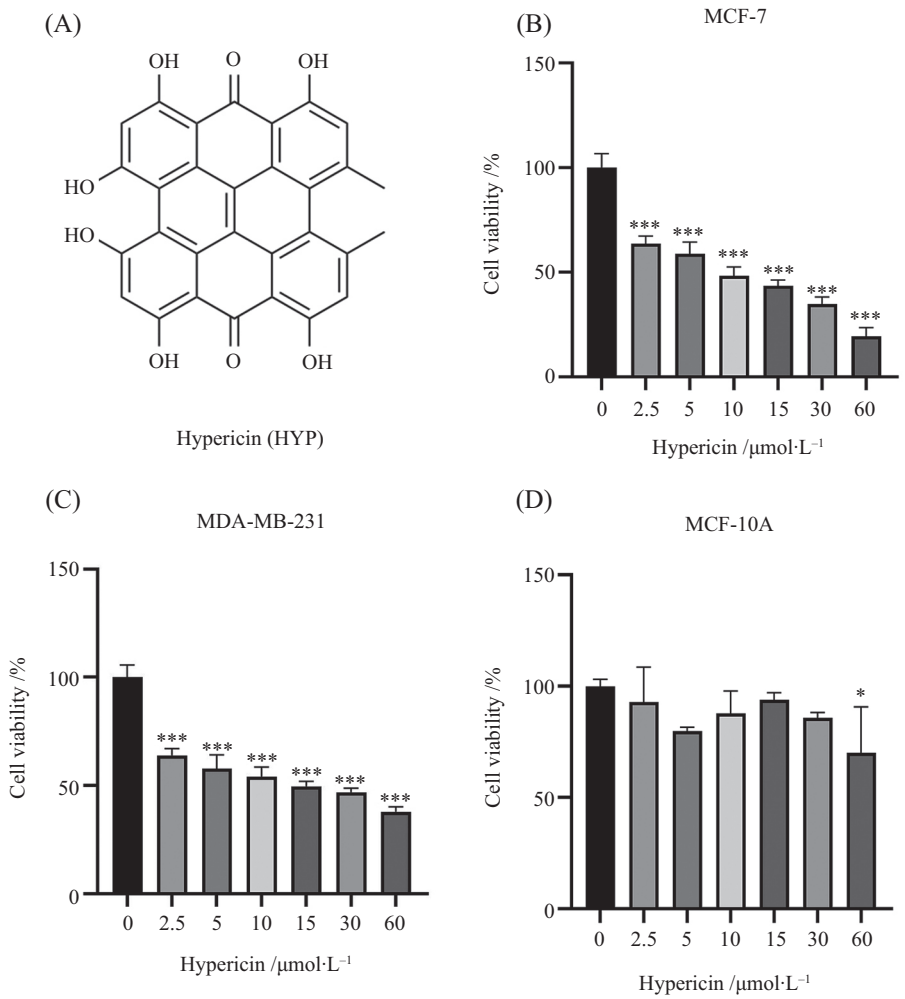
1.4 统计学方法

所有数据均使用GraphPad Prism 9.5软件进行分析。各因素的比较分析采用双向方差分析, 多样本的比较采用单因素方差分析和采用最小显著性差(LSD)方法, $P<0.05$具有统计学意义。

2 结果

2.1 HYP抑制乳腺癌细胞增殖

为探究HYP对人乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231以及人乳腺上皮细胞MCF-10A的影响, 采用连续的HYP处理24 h, 并用CCK-8法进行检测, 结果见图1B~图1D。结果显示, 与对照组相比HYP处

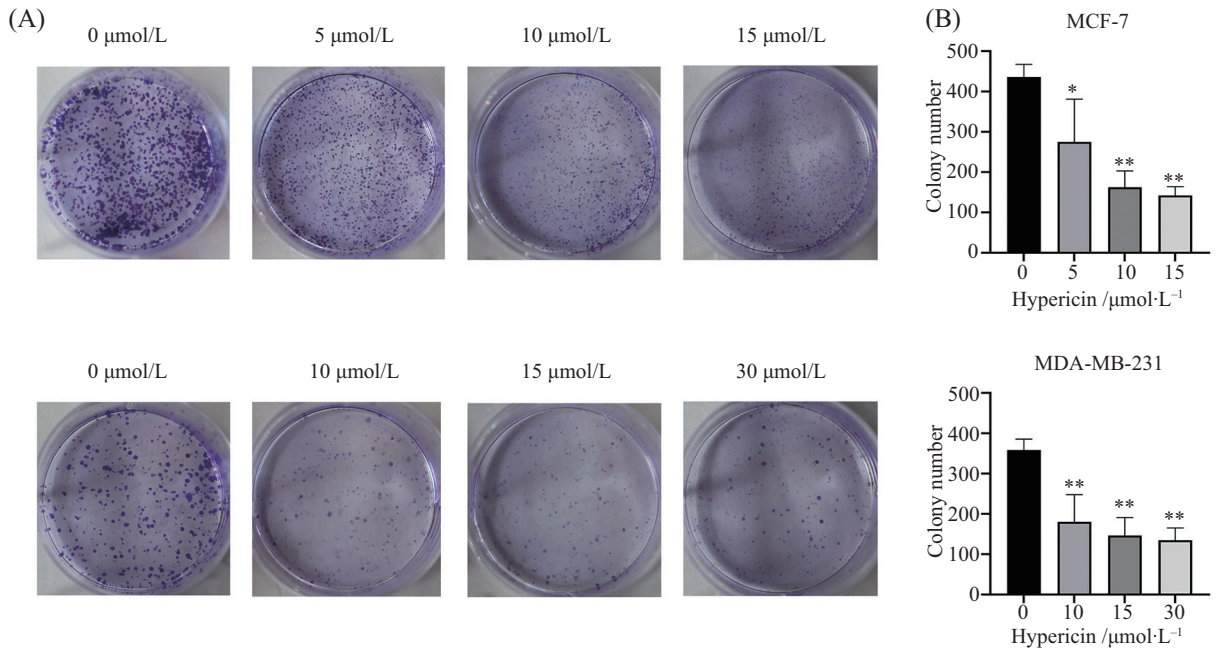


A: 金丝桃素的化学结构; B: MCF-7细胞中, 不同浓度HYP处理后的细胞活性变化; C: MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后的细胞活性变化; D: MCF-10A细胞中, 不同浓度HYP处理后的细胞活性变化; *$P<0.05$, ***$P<0.001$, HYP处理组与对照组相比; $n=3$。

A: the chemical structure of hypericin; B: in MCF-7 cells, the changes of cell activity after different concentrations of HYP treatment; C: in MDA-MB-231, the changes of cell activity after different concentrations of HYP treatment; D: in MCF-10A cells, the changes of cell activity after different concentrations of HYP treatment; *$P<0.05$, ***$P<0.001$, HYP treatment group compared with control group; $n=3$.

图1 不同浓度HYP对细胞活性的影响

Fig.1 Effect of hypericin at different concentrations on cell activity



A: MCF-7、MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后乳腺癌细胞的克隆形成情况; B: MCF-7、MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后乳腺癌细胞的克隆形成率分析。*P<0.05, **P<0.01, HYP处理组与对照组相比; n=3。

A: the clonal formation of breast cancer cells in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after different concentrations of HYP treatment; B: analysis of clonal formation rate of breast cancer cells treated with different concentrations of HYP in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *P<0.05, **P<0.01, HYP treatment group compared with control group; n=3.

图2 不同浓度HYP对乳腺癌细胞克隆形成的影响

Fig.2 Effect of hypericin at different concentrations on breast cancer cells clonal formation

理后的乳腺癌细胞活力明显下降(P<0.001), HYP处理MCF-7细胞24 h的半抑制浓度(IC_{50})为10 μmol/L, MDA-MB-231细胞24 h的IC_{50}为15 μmol/L。而在两种细胞的IC_{50}发挥作用的同时对正常细胞MCF-10A无明显影响, 对于MCF-10A细胞只有在HYP浓度高达60 μmol/L的时候才有具有抑制作用(P<0.05)。结果表明, HYP在抑制乳腺癌细胞活性的同时, 对正常细胞无明显影响。为进一步探讨HYP的抗增殖作用, 采用克隆形成实验检测细胞克隆形成情况, 结果见图2。结果显示, 随着HYP浓度的升高, MCF-7和MDA-MB-231细胞的单克隆数明显减少, 具有显著性差异(P<0.05), 表明HYP显著抑制了两种细胞系的克隆形成效率。

2.2 HYP引起ROS的变化并导致LDH的释放

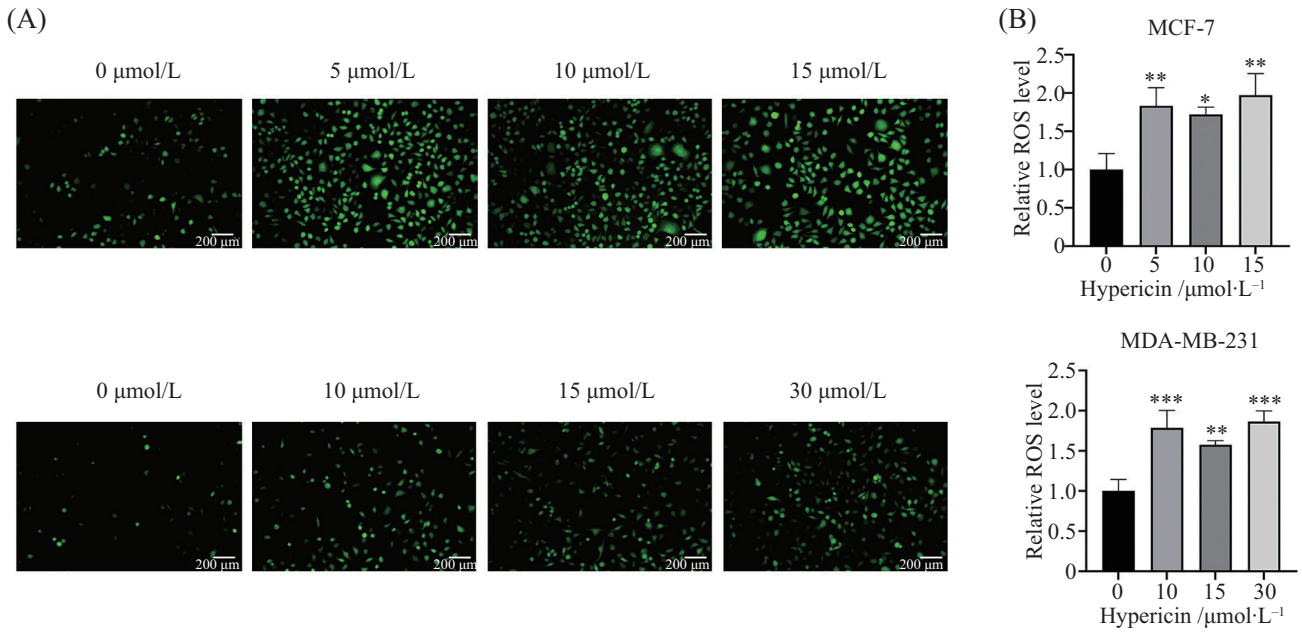
为确定HYP是否引起细胞内ROS的变化, 采用DCFH-DA探针对细胞内ROS的积累情况进行检测, 结果见图3。结果显示, 与对照组相比, HYP处理组中DCFH-DA探针所产生的绿色荧光明显增多(P<0.01)。结果表明HYP能够升高MCF-7和MDA-MB-231细胞内ROS的水平, 导致大量ROS在细胞内聚集。为确定HYP是否能够增大LDH的释放量, 采用LDH释放检测实验对LDH的变化进行检测, 结果见图4。结果显示, 与对照组相比随着HYP浓度的增加, MCF-7和MDA-MB-231细胞的LDH释放量逐渐增多(P<0.05)。结果表明, LDH释放量增多, 细胞膜受损, 细胞毒性逐渐增强。

2.3 Fer-1能够恢复HYP所影响的细胞活力

为探究铁死亡抑制剂Fer-1是否能够逆转HYP所影响的细胞活力, MCF-7细胞按对照组、10 μmol/L的HYP处理组以及10 μmol/L的HYP和10 μmol/L的Fer-1共处理组的分组处理24 h, MDA-MB-231细胞按对照组、15 μmol/L的HYP处理组以及15 μmol/L的HYP和10 μmol/L的Fer-1共处理组的分组处理24 h, 采用CCK-8法对其细胞活性进行检测, 结果见图5。结果显示, 与HYP处理组相比HYP和Fer-1共处理组的细胞活力更高(P<0.05), 结果表明铁死亡抑制剂Fer-1能够挽救HYP影响的细胞活力。

2.4 HYP升高乳腺癌细胞内Fe^{2+}水平、降低GSH的含量

为确定HYP是否引起细胞内Fe^{2+}含量的变化,

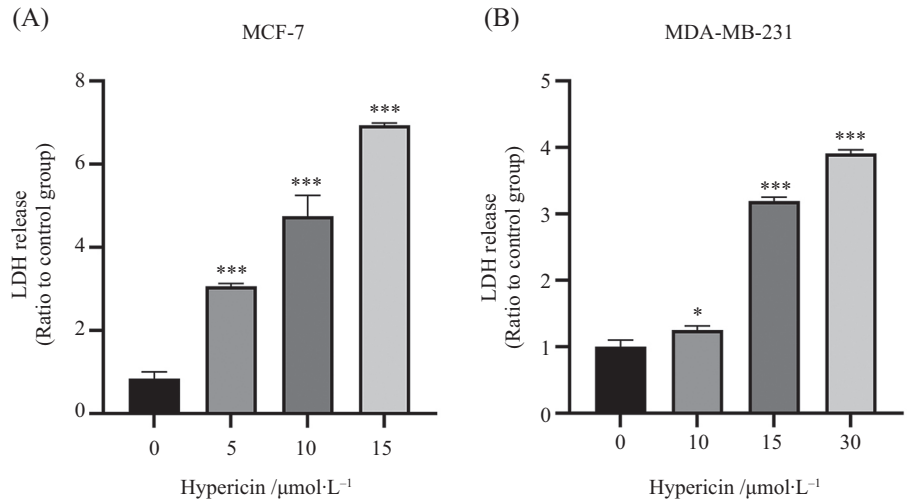


A: MCF-7、MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内ROS变化荧光; B: MCF-7、MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内ROS变化荧光定量分析; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, HYP处理组与对照组相比; n=3。

A: intracellular ROS fluorescence changes after different concentrations of HYP treatment in MCF-7 and MDA-MB-231 cells; B: fluorescence quantitative analysis of intracellular ROS changes in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after treatment with different concentrations of HYP; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, HYP treatment group compared with control group; n=3.

图3 不同浓度HYP对乳腺癌细胞内ROS的影响

Fig.3 Effect of hypericin at different concentrations on ROS in breast cancer cells



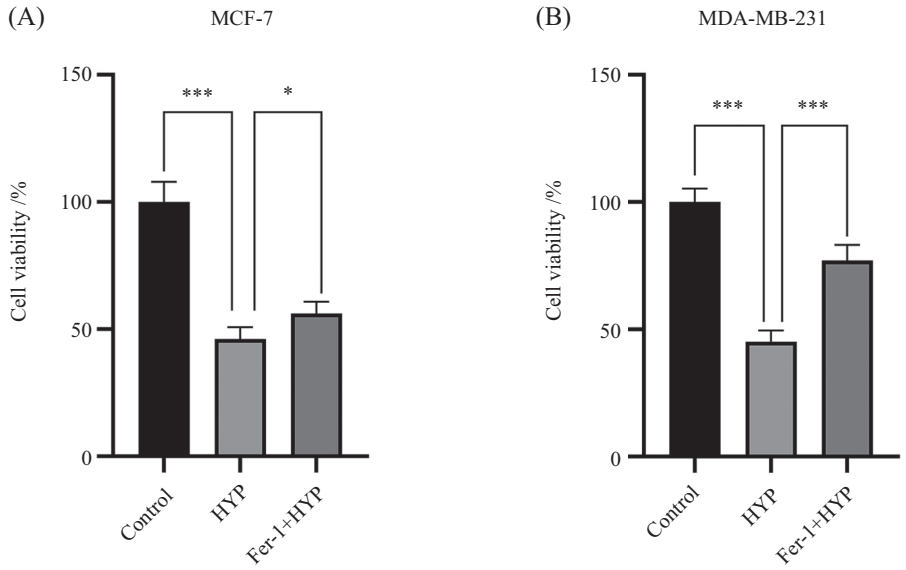
A: MCF-7细胞中, 不同浓度HYP处理后LDH的释放情况; B: MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后LDH的释放情况。*P<0.05, ***P<0.001, HYP处理组与对照组相比; n=3。

A: LDH release in MCF-7 cells after HYP treatment at different concentrations; B: LDH release in MDA-MB-231 cells after HYP treatment at different concentrations. *P<0.05, ***P<0.001, HYP treatment group compared with control group; n=3.

图4 不同浓度HYP对乳腺癌细胞内LDH释放的影响

Fig.4 Effect of hypericin at different concentrations on LDH release in breast cancer cells

采用组织铁测定试剂盒对细胞内游离的Fe^{2+}积累进行检测, 结果见图6。结果显示, 与对照组相比随着HYP给药浓度的增加, 细胞内Fe^{2+}的含量明显增多(P<0.01)。结果表明, HYP能够升高MCF-7和MDA-MB-231细胞内Fe^{2+}的水平, 且呈剂量依赖性。为确定HYP是否引起细胞内GSH含量的变化, 采用还原型GSH测定试剂盒对细胞内GSH含量进行检测, 结果见图7。结果显示, 对照组相比随着HYP给药浓度

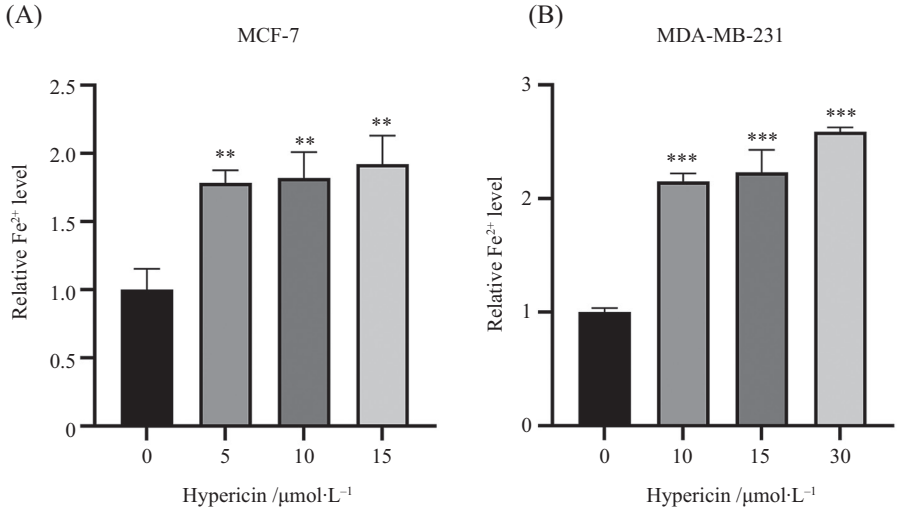


A: MCF-7细胞中, HYP处理及HYP与Fer-1共处理后的细胞活性变化; B: MDA-MB-231细胞中, HYP处理及HYP与Fer-1共处理后的细胞活性变化; *P<0.05, ***P<0.001, HYP处理组与对照组及HYP与Fer-1共处理组相比; n=3。

A: changes of cell activity in MCF-7 cells after HYP treatment and HYP plus Fer-1 co-treatment; B: changes of cell activity in MDA-MB-231 cells after HYP treatment and HYP plus Fer-1 co-treatment; *P<0.05, ***P<0.001, HYP treatment group compared with both the control group and HYP plus Fer-1 co-treatment group; n=3.

图5 Fer-1对HYP所抑制乳腺癌细胞活性的影响

Fig.5 Effect of Fer-1 on the activity of breast cancer cells inhibited by hypericin



A: MCF-7细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内Fe^{2+}的变化; B: MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内Fe^{2+}的变化; **P<0.01, ***P<0.001, HYP处理组与对照组相比; n=3。

A: changes of intracellular Fe^{2+} in MCF-7 cells after treatment with different concentrations of HYP; B: the changes of Fe^{2+} in MDA-MB-231 cells after different concentrations of HYP treatment; **P<0.01, ***P<0.001, HYP treatment group compared with control group; n=3.

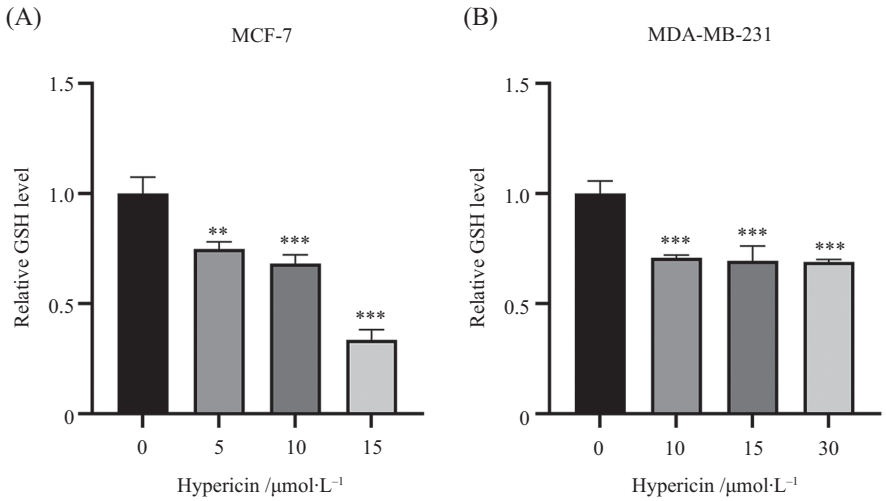
图6 不同浓度HYP对乳腺癌细胞内Fe^{2+}的影响

Fig.6 Effect of hypericin at different concentrations on free iron bivalent in breast cancer cells

的增加, 细胞内GSH含量降低(P<0.01), 其中HYP对MCF-7内GSH含量的降低作用呈剂量依赖, 而10 μmol/L及更高浓度的HYP对于MDA-MB-231细胞内GSH含量的降低效果均维持在30%左右。结果表明, HYP能够降低MCF-7和MDA-MB-231细胞内GSH的水平。

2.5 HYP降低乳腺癌细胞内xCT、GPX4蛋白含量

为探究HYP对铁死亡相关蛋白的影响, 采用免疫印迹法检测HYP处理后乳腺癌细胞内

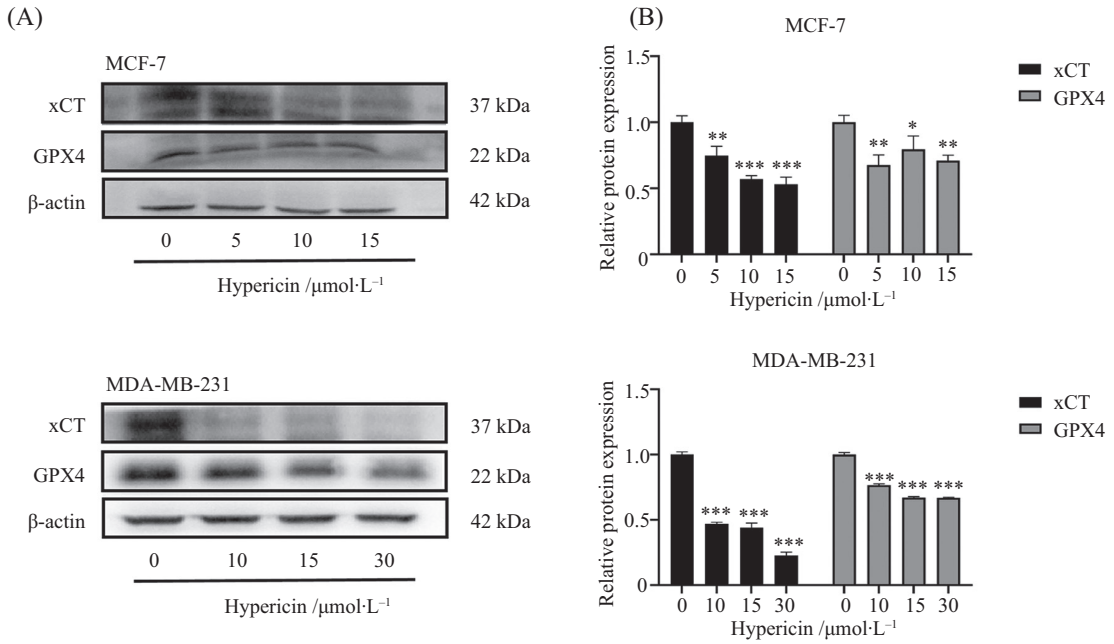


A: MCF-7细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内GSH含量的变化; B: MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内GSH含量的变化; **P<0.01, ***P<0.001, HYP处理组与对照组相比; n=3。

A: the change of intracellular GSH content in MCF-7 cells after treatment with different concentrations of HYP; B: changes of intracellular GSH content in MDA-MB-231 cells after HYP treatment at different concentrations; **P<0.01, ***P<0.001, HYP treatment group compared with control group; n=3.

图7 不同浓度HYP对乳腺癌细胞内GSH含量的影响

Fig.7 Effect of hypericin with different concentration on GSH content in breast cancer cells



A: MCF-7细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内xCT、GPX4表达情况; B: MDA-MB-231细胞中, 不同浓度HYP处理后细胞内xCT、GPX4表达情况的灰度分析; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, HYP处理组与对照组相比; n=3。

A: the expression of xCT and GPX4 in MCF-7 cells after different concentrations of HYP treatment; B: grayscale analysis of the expression of xCT and GPX4 in MDA-MB-231 cells after different concentrations of HYP treatment; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, HYP treatment group compared with control group; n=3.

图8 不同浓度HYP对乳腺癌细胞内xCT、GPX4蛋白表达情况的影响

Fig.8 Effect of hypericin at different concentrations on expression of xCT and GPX4 proteins in breast cancer cells

xCT、GPX4蛋白的表达情况, 结果见图8。与对照组相比HYP处理后，xCT、GPX4蛋白表达含量降低。

3 讨论

众所周知, 肿瘤异质性是全球至今无法攻克的难题。肿瘤异质性分为肿瘤内异质性和肿瘤间异

质性两种。肿瘤内异质性和肿瘤间异质性都存在高度的分子和表型差异，根据这些差异，可将乳腺癌分为多种亚型。乳腺癌分为以下4个亚型分别是Luminal A、Luminal B、ERBB2$^+$及三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)[21]。MCF-7细胞是Luminal A型乳腺癌细胞系。Luminal A型是最常见的分子亚型，即雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性且PR高表达，而表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)阴性、Ki-67低表达，约占所有乳腺癌的70%，是预后较好的一个亚型[21]。MDA-MB-231细胞是TNBC细胞系。TNBC是一种非特殊型浸润性导管癌，ER、PR和HER-2均为阴性，约占全部乳腺癌15%~20%，是所有亚型中预后最差的一种[21]。

由于乳腺癌的发病率以及手术和化疗等传统治疗方法的不良影响，因此亟需对乳腺癌的未知事实的探索和新药的研发。HYP对乳腺癌细胞的增殖具有抑制作用，并可诱导乳腺癌细胞凋亡[22]。HYP在诱导MDA-MB-175-VII、MDA-MB-231细胞发生凋亡的过程中，*p53*基因表达上调，从而导致细胞周期阻滞和凋亡，HYP对恶性细胞的凋亡和细胞毒性作用可能是通过*p53*的过表达来介导的[23]。高剂量的HYP诱导大量活性氧的产生和严重的内质网应激，从而活化CHOP，并激活CHOP/TRIB3/Akt/mTOR级联反应，触发自噬诱导细胞死亡[24]。随着研究的进展，HYP调控细胞凋亡、自噬等细胞死亡途径的机制逐渐被揭示，但HYP诱导乳腺癌细胞铁死亡的作用及机制目前尚不清楚。本研究发现，HYP可显著抑制乳腺癌MCF-7和MDA-MB-31细胞增殖、克隆形成能力，但两种细胞半抑制浓度的HYP对正常乳腺上皮细胞MCF-10A的活力无明显影响。MCF-10A细胞是一种非致瘤性上皮细胞系，常在乳腺癌研究中作为对照。由于金丝桃素对正常乳腺上皮细胞MCF-10A的活力无明显影响，因此后续实验不选择正常乳腺上皮细胞MCF-10A作为对照。

铁死亡的发生发展涉及多个信号通路和因子的影响。ROS与肿瘤细胞的生长和死亡密切相关，促进癌细胞的增殖、存活和转移[25]。然而，过量的ROS会增加细胞氧化应激最终导致细胞死亡，ROS在细胞中的积累是铁死亡的直接原因之一[26]。LDH是一类稳定存在于所有的细胞中的胞质酶，当质膜和细胞膜受损时，胞内的LDH会迅速释放到胞外。铁死亡对细胞的毒害作用可以通过各种亲脂性自由基捕获剂如Fer-1消除[27-28]。Fer-1是一种含有芳烷胺的抗氧化物，可以有效降低细胞内的不稳定铁池、ROS的含量，抑制细胞内氧化应激，从而保护细胞[29]。铁是一种生物体必需的金属元素，拥有着极其重要的生物学功能。铁在细胞内大部分是呈亚铁形式存在的不稳定铁池，可以通过芬顿反应直接催化自由基形成，并进一步促进脂质过氧化，从而诱导铁死亡的发生[8]。铁死亡发生过程中氨基酸和谷胱甘肽的代谢发生变化，细胞内胱氨酸的摄入减少，消耗GSH，抑制System Xc$^-$从而诱导铁死亡的发生[30-32]。本研究发现HYP能够快速升高乳腺癌MCF-7和MDA-MB-31细胞内的ROS水平，损伤细胞膜促使细胞内LDH释放，这些作用表明HYP或许能够诱导MCF-7和MDA-MB-231细胞发生铁死亡。相同浓度的HYP对于两株细胞内的ROS和LDH的影响效果类似。铁死亡抑制剂Fer-1能够恢复HYP所影响的细胞活力，这一结果表明HYP诱导乳腺癌细胞发生了铁死亡。与MCF-7细胞相比，Fer-1对HYP所影响的MDA-MB-231细胞活力的恢复效果更为明显。此外，HYP能够升高MCF-7和MDA-MB-231细胞内Fe^{2+}的水平，降低细胞内GSH的含量。相同浓度的HYP对于两株细胞内的Fe^{2+}的影响效果类似，HYP对MCF-7内GSH含量的降低作用呈剂量依赖，对MDA-MB-231细胞内GSH的含量的降低作用与剂量无关。

System Xc$^-$是非Na^+依赖性的交换转运蛋白，包括重链亚基溶质载体家族3成员2和轻链亚基xCT。轻链亚基xCT是System Xc$^-$发挥作用的关键，xCT通过允许输入胱氨酸发挥对铁死亡的保护作用，胱氨酸是抗氧化分子GSH生物合成中的限速步骤[33-34]。xCT的表达水平决定了GPX4在乳腺癌中的表达，与匹配的正常样本相比，GPX4在乳腺癌组织的一个亚群中强烈上调，并且这与xCT的表达量增加密切相关[35]。复旦分型中的腔内雄激素受体型是一种对铁死亡敏感的TNBC亚型，该亚型的患者能够通过靶向GPX4进行治疗[36]。耐药持久的乳腺癌细胞对GPX4有依赖性，它们易受到GPX4抑制引起的铁死亡影响[37]。本实验结果显示，HYP处理后乳腺癌细胞内xCT、GPX4蛋白表达含量减少。相同浓度的HYP处理后MDA-MB-231细胞内的xCT蛋白含量与MCF-7细胞相比明显减少，但GPX4含量相差不大。

本研究通过CCK-8实验以及克隆形成实验验证了HYP对乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231增殖的抑制作用，且HYP在发挥对乳腺癌细胞的抑制作用的同时对正常细胞活力无影响。此外本研究发现HYP能够导致细胞内ROS积累以及LDH释放，升高MCF-7和MDA-MB-231细胞内Fe^{2+}水平，降低细胞内GSH的含量，下调xCT和GPX4的蛋白含量。SHUI等[18]以非小细胞肺癌A549细胞系为研究对象，研究发现HYP能够引起细胞内发生脂质过氧化和细胞内GSH、GPX4耗竭。他们初步探究了铁死亡抑制剂Lip-1和Fer-1对HYP所影响的MCF-7细胞活力的恢复作用[18]。本研究进一步解释了金丝桃素对MCF-7、MDA-MB-231细胞铁死亡的作用机制。但关于金丝桃素对MCF-7、MDA-MB-231细胞的作用是否存在结合位点差异目前尚不清楚，仍待进一步的实验进行探究。

综上所述，HYP能够抑制乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231的生长，诱导乳腺癌细胞发生铁死亡，且铁死亡抑制剂Fer-1能够挽救HYP影响的细胞活力。本研究从“铁死亡”角度阐释HYP作用机制，为HYP抗乳腺癌的临床应用提供了实验依据；探究HYP诱导乳腺癌细胞死亡的更多方式及其相关机制，为乳腺癌天然抗癌药物的设计和开发提供了新的思路。

参考文献 (References)

[1] 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): 229-63.

[2] 于洗河, 张景茹, 降海蕊, 等. 中国女性1990—2019年宫颈癌和乳腺癌疾病负担分析[J]. 中国公共卫生(YU X H, ZHANG J R, JIANG H R, et al. Disease burden of cervical cancer and breast cancer in Chinese women in 1990 and 2019 [J]. School of Public Health), 2022, 38(5): 534-8.

[3] TRAYES K P, COKENAKES S E H. Breast cancer treatment [J]. Am Fam Physician, 2021, 104(2): 171-8.

[4] SHIEN T, IWATA H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2020, 50(3): 225-9.

[5] KERR A J, DODWELL D, MCGALE P, et al. Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: a systematic review of their effects on mortality [J]. Cancer Treat Rev, 2022, 105: 102375.

[6] BURSTEIN H J, CURIGLIANO G, THÜRLIMANN B, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. gallen international consensus guidelines for treatment of early breast cancer 2021 [J]. Ann Oncol, 2021, 32(10): 1216-35.

[7] THILAGAVATHI R, PRIYANKHA S, KANNAN M, et al. Compounds from diverse natural origin against triple-negative breast cancer: a comprehensive review [J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 101(1): 218-43.

[8] SU Y, ZHAO B, ZHOU L, et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs [J]. Cancer Lett, 2020, 483: 127-36.

[9] RIZZO P, ALTSCHMIED L, RAVINDRAN B M, et al. The biochemical and genetic basis for the biosynthesis of bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L., one of the largest medicinal crops in Europe [J]. Genes, 2020, 11(10): 1210.

[10] 胡佳慧, 侯万丰, 孔金明, 等. 金丝桃素药理研究进展[J]. 药物生物技术(HU J H, HOU W F, KONG J M, et al. Research progress of hypericin in pharmacological applications [J]. Pharmaceutical Biotechnology), 2014, 21(4): 377-80.

[11] ZIRAK N, SHAFIEE M, SOLTANI G, et al. *Hypericum perforatum* in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders: current evidence and potential mechanisms of action [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8496-508.

[12] KAEHLER S T, SINNER C, CHATTERJEE S S, et al. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus [J]. Neurosci Lett, 1999, 262(3): 199-202.

[13] WANG H, YANG X, LAI H, et al. Novel antidepressant mechanism of hypericin: role of connexin 43-based gap junctions [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115545.

[14] 黄慧星, 郑学礼. 金丝桃素抗登革病毒活性研究[J]. 中国病原生物学杂志(HUANG H X, ZHENG X L. Study on inhibition of the dengue virus by hypericin [J]. Journal of Pathogen Biology), 2023, 18(8): 886-91,98.

[15] ZHANG Y, CHEN H, ZOU M, et al. Hypericin inhibit alphacoronavirus replication by targeting 3CL protease [J]. Viruse, 2021, 13(9): 1825.

[16] LI Y, WANG S, ZHAO Y, et al. A model *in vitro* study using hypericin: tumor-versus necrosis-targeting property and possible mechanisms [J]. Biology, 2020, 9(1): 13.

[17] JENDZELOVSKÝ R, MIKES J, KOVAL' J. Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells [J]. Photochem Photobiol Sci, 2009, 8(12): 1716-23.

[18] SHUI S, ZHAO Z, WANG H, et al. Non-enzymatic lipid peroxidation initiated by photodynamic therapy drives a distinct ferroptosis-like cell death pathway [J]. Redox Biol, 2021, 45: 102056.

[19] THEODOSSIOU T A, OLSEN C E, JONSSON M, et al. The diverse roles of glutathione-associated cell resistance against hypericin photodynamic therapy [J]. Redox Biol, 2017, 12: 191-7.

[20] 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): 1060-72.

[21] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021年版)[J]. 中国癌症杂志(BREAST CANCER COMMITTEE OF CHINA ANTI-CANCER ASSOCIATION. Guidelines and norms for the diagnosis and treatment of breast cancer of the China Anti-Cancer Association, 2021 [J]. China Oncology), 2021, 31(10): 954-1040.

[22] 陈小梅, 李慧玉, 曲涛, 等. 金丝桃素介导的光动力学疗法强化CIK对人乳腺癌细胞的抑制作用[J]. 医药导报(CHEN X M, LI

H Y, QU T, et al. Inhibitory effects of CIK on breast cancer cells intensified by hypericin mediated photodynamic therapy [J]. Herald of Medicine), 2021, 40(10): 1318-24.

[23] GHIAS GAMASAEE N A, RADMANSOURI M, VAND S, et al. Hypericin induces apoptosis in MDA-MB- 175-VII cells in lower dose compared to MDA-MB-231 [J]. Arch Iran Med, 2018, 21(9): 387-92.

[24] LIN S, YANG L, SHI H, et al. Endoplasmic reticulum-targeting photosensitizer hypericin confers chemo-sensitization towards oxaliplatin through inducing pro-death autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 87: 54-68.

[25] RECZEK C R, CHANDEL N S. ROS Promotes cancer cell survival through calcium signaling [J]. Cancer Cell, 2018, 33(6): 949-51.

[26] WANG H, CHENG Y, MAO C, et al. Emerging mechanisms and targeted therapy of ferroptosis in cancer [J]. Mol Ther, 2021, 29(7): 2185-208.

[27] WOLPAW A J, SHIMADA K, SKOUTA R, et al. Modulatory profiling identifies mechanisms of small molecule-induced cell death [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(39): 771-80.

[28] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-85.

[29] MIOTTO G, ROSSETTO M, DI PAOLO M L, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1 [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101328.

[30] FRIEDMANN A J P, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator GPX4 triggers acute renal failure in mice [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(12): 1180-91.

[31] YAGODA N, VON RECHENBERG M, ZAGANJOR E, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage dependent anion channels [J]. Nature, 2007, 447(7146): 864-8.

[32] ANGELI J P F, SHAH R, PRATT D A, et al. Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities [J]. Trends Pharmacol Sci 2017, 38(5): 489-98.

[33] GAO M, MONIAN P, QUADRI N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. Mol Cell, 2015, 59(2): 298-308.

[34] BROOKES M J, HUGHES S, TURNER F E, et al. Modulation of iron transport proteins inhuman colorectal carcinogenesis [J]. Gut, 2006, 55(10): 1449.

[35] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-28.

[36] LEE N, CARLISLE A E, PEPPERS A, et al. xCT-driven expression of GPX4 determines sensitivity of breast cancer cells to ferroptosis inducers [J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 317.

[37] 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.