

# 藜芦胺对人胶质母细胞瘤细胞U251增殖的影响及机制<sup>Δ</sup>

曹梓珍\*,张琳,傅若秋,赵祎博,陈翔,陈剑鸿<sup>#</sup>(陆军特色医学中心药剂科,重庆 400042)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)22-2734-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.22.08



**摘要** **目的** 探究藜芦胺(VTM)对人胶质母细胞瘤(GBM)细胞U251增殖的影响及其潜在机制。**方法** 借助网络药理学方法,筛选VTM干预GBM的铁死亡相关交集靶点,并进行基因本体、京都基因和基因组百科全书富集分析。以U251细胞为对象,采用CCK-8法、细胞克隆形成实验、细胞形态变化观察、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针法、FerroOrange荧光探针法、Western blot实验对VTM抑制U251细胞增殖的作用及可能机制进行验证。**结果** 共筛选出VTM干预GBM的铁死亡相关交集靶点462个,富集于氧化应激、细胞凋亡等生物学过程,胞质囊泡、线粒体膜等细胞成分,影响二价铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )结合、DNA转录过程等分子功能,以及铁死亡、磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路等。40、60、80、100、120、140  $\mu\text{mol/L}$ 的VTM均可显著降低细胞存活率( $P<0.01$ );40、80、120  $\mu\text{mol/L}$ 的VTM可使细胞萎缩、细胞核破碎,可显著抑制其克隆形成,显著提高其活性氧(ROS)、 $\text{Fe}^{2+}$ 水平,并可不同程度地上调核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶1(HO-1)蛋白的表达,下调谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白的表达( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。**结论** VTM可抑制U251细胞的增殖,促进细胞内ROS和 $\text{Fe}^{2+}$ 的蓄积,从而诱导铁死亡,上述作用可能与调控Nrf2/HO-1/GPX4信号通路有关。

**关键词** 藜芦胺;胶质母细胞瘤;铁死亡;核转录因子红系2相关因子2/血红素加氧酶1/谷胱甘肽过氧化物酶4信号通路

## Effects and mechanism of veratramine on the proliferation of human glioblastoma U251 cells

CAO Zizhen, ZHANG Lin, FU Ruoqiu, ZHAO Yibo, CHEN Xiang, CHEN Jianhong (Dept. of Pharmacy, Army Medical Center of PLA, Chongqing 400042, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the effects and potential mechanism of veratramine (VTM) on the proliferation of human glioblastoma U251 cells. **METHODS** The network pharmacology methods were adopted to screen the targets of ferroptosis related to the effects of VTM on glioblastoma, and to conduct gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis. Using U251 cells as the object, CCK-8 assay, the observation of cell morphological changes, DCFH-DA fluorescence probe method, FerroOrange fluorescence probe method and Western blot assay were used to validate the inhibitory effects of VTM on U251 cell proliferation and its possible mechanism. **RESULTS** Totally 462 targets of ferroptosis related to the effects of VTM on glioblastoma were screened out; they mainly enriched in biological processes such as oxidative stress and apoptosis, and cellular components such as cytoplasmic vesicles and mitochondrial membranes; they affected molecular functions such as iron ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) binding and DNA transcription processes, as well as iron death and phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathways. VTM with 40, 60, 80, 100, 120 and 140  $\mu\text{mol/L}$  could significantly reduce the cell survival rate ( $P<0.01$ ); VTM with 40, 80 and 120  $\mu\text{mol/L}$  could cause cell atrophy and nuclear fragmentation, significantly inhibit the clone formation, increase the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and  $\text{Fe}^{2+}$  levels, increase the expressions of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HO-1) protein to different extents, while down-regulate the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) protein ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** VTM can inhibit the proliferation of U251 cells, and promote the accumulation of intracellular ROS and  $\text{Fe}^{2+}$ , thus inducing ferroptosis; its mechanism might be related to the regulation of the Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway.

**KEYWORDS** veratramine; glioblastoma; ferroptosis; Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)又称恶性胶质瘤,是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤,约占有

中枢神经系统肿瘤的33%,具有恶性程度高、致死率高、复发率高的特点<sup>[1-2]</sup>。目前,GBM的临床治疗以手术联合放疗及替莫唑胺化疗的传统疗法为主,但该疗法不良反应大,患者易出现化疗耐药且预后较差<sup>[2]</sup>,因此迫切需要寻找高效、低毒的辅助药物或替代疗法。

近年来,天然产物在肿瘤研究领域扮演了重要角色。藜芦胺(veratramine, VTM)为甾体生物碱类成分,是百合科植物藜芦的有效成分之一。体外研究表明,VTM可通过诱导肿瘤细胞自噬、凋亡来抑制其增殖<sup>[3-4]</sup>。

**Δ 基金项目** 重庆市研究生教育“课程思政”示范项目(No. YKCSZ23057);重庆市卫生计生委中医药科技项目(No. ZY201801004)

\* **第一作者** 药师,硕士研究生。研究方向:药理学。E-mail: 1129457183@qq.com

**# 通信作者** 主任药师,教授,博士生导师。研究方向:抗感染与化疗药物的分子机制、天然植物药作用机制。电话:023-68746956。E-mail: chenjh-110@263.net

铁死亡是一种由铁依赖性脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)异常累积所引发的非凋亡性程序性死亡方式,与恶性肿瘤、神经退行性疾病等多种疾病密切相关,并在肿瘤细胞生长、耐药等方面发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。本课题组前期预实验证实,VTM可抑制GBM细胞的增殖,但这种作用是否与铁死亡过程有关以及其具体作用机制尚不清楚。为此,本研究拟通过网络药理学方法预测VTM作用于GBM的潜在靶点、基因功能及信号通路;同时,拟借助体外细胞实验,初步验证该成分通过诱导铁死亡来抑制GBM细胞活性的可能机制,以期为GBM治疗和新药研究提供新思路。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括3111型CO<sub>2</sub>细胞培养箱、EVOSF1型荧光显微镜(美国Thermo Fisher Scientific公司),CKX41型光学倒置显微镜(日本Olympus公司),STNERGYH1型酶标仪(美国Agilent公司),C6型流式细胞仪(美国BD公司),165-8001型蛋白电泳仪、Chem I Doc型超高灵敏度化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

VTM原料药(批号HY-N0837,纯度99.61%)、CCK-8试剂盒(批号HY-K0301)均购自美国MedChemExpress公司;DMEM高糖培养基(批号2327860)、胎牛血清(批号10091148)均购自美国Gibco公司;4%多聚甲醛固定液(批号P0099)、结晶紫染色液(批号C0121)、胰酶消化液(批号C0201)、Western blot细胞裂解液(批号P0031)、BCA蛋白浓度测定试剂盒增强型(批号P0009)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针(批号S0033)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Ferro-Orange荧光探针(批号F374)购自东仁化学科技(上海)有限公司;兔源谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)单克隆抗体(批号T56959)购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;兔源血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)单克隆抗体(批号ab214039)、兔源核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)单克隆抗体(批号ab137550)均购自英国Abcam公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(批号2118S)购自美国CST公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(批号ZB-2306)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 细胞

人GBM细胞U251购自美国ATCC菌种保藏中心。

## 2 方法与结果

### 2.1 网络药理学分析

#### 2.1.1 VTM作用靶点预测

以“VTM”为关键词,在PharmMapper数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、SwissTargetPrediction

数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、TargetNet数据库(<http://targetnet.scbdd.com/>)、Batman-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)中检索其可能的作用靶点,合并、去重后,共筛选得到VTM预测靶点16 397个。

#### 2.1.2 GBM和铁死亡相关靶点获取

以“glioblastoma”“glioma”为关键词,在CTD数据库(<https://ctdbase.org/>)、DrugBank数据库(<https://go.drugbank.com/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM数据库(<https://omim.org/>)、PharmGKB数据库(<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)中进行检索,并在PubMed数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行补充检索,合并、去重后,共得到GBM疾病相关靶点5 865个。通过FerrDb数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/>)获取铁死亡相关靶点(ferroptosis-related genes, FRGs)1 043个。

#### 2.1.3 VTM干预靶点的获取及富集分析

将上述获取到的药物预测靶点、疾病相关靶点、FRGs进行交叉,利用R语言的“Venn”包进行分析,获取VTM干预GBM的铁死亡相关交集靶点462个。利用UniProt数据库(<http://www.uniprot.org>)对上述交集靶点进行标准化校正,运用R语言的“ClusterProfiler”包进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析以及京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为条件进行筛选并对富集基因数与总基因数的比值(简称“富集基因占比”)进行排序(由大到小),再运用“ggplot2”包对富集分析结果进行可视化展示,得到VTM干预GBM的主要功能及可能途径。

GO功能富集结果(图1)显示,VTM干预GBM的生物学过程(biological process, BP)主要涉及氧化应激、细胞凋亡、对金属离子的响应、自噬调节等;细胞成分(cellular components, CC)主要涉及胞质囊泡、线粒体膜、细胞膜和核糖体等部位;分子功能(molecular function, MF)主要包括影响二价铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )结合、DNA转录过程和多个氧化还原酶活性等。

KEGG富集结果(图2)显示,VTM干预GBM主要涉及铁死亡、磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, 又称Akt)、自噬、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、细胞凋亡等信号通路。

GO和KEGG富集分析结果显示,VTM干预GBM涉及多条信号通路,其中氧化应激和铁死亡信号通路均排名靠前。基于此,本研究选择与氧化应激、铁死亡均相关的信号通路Nrf2/HO-1/GPX4<sup>[6-9]</sup>作为后续研究的重点。

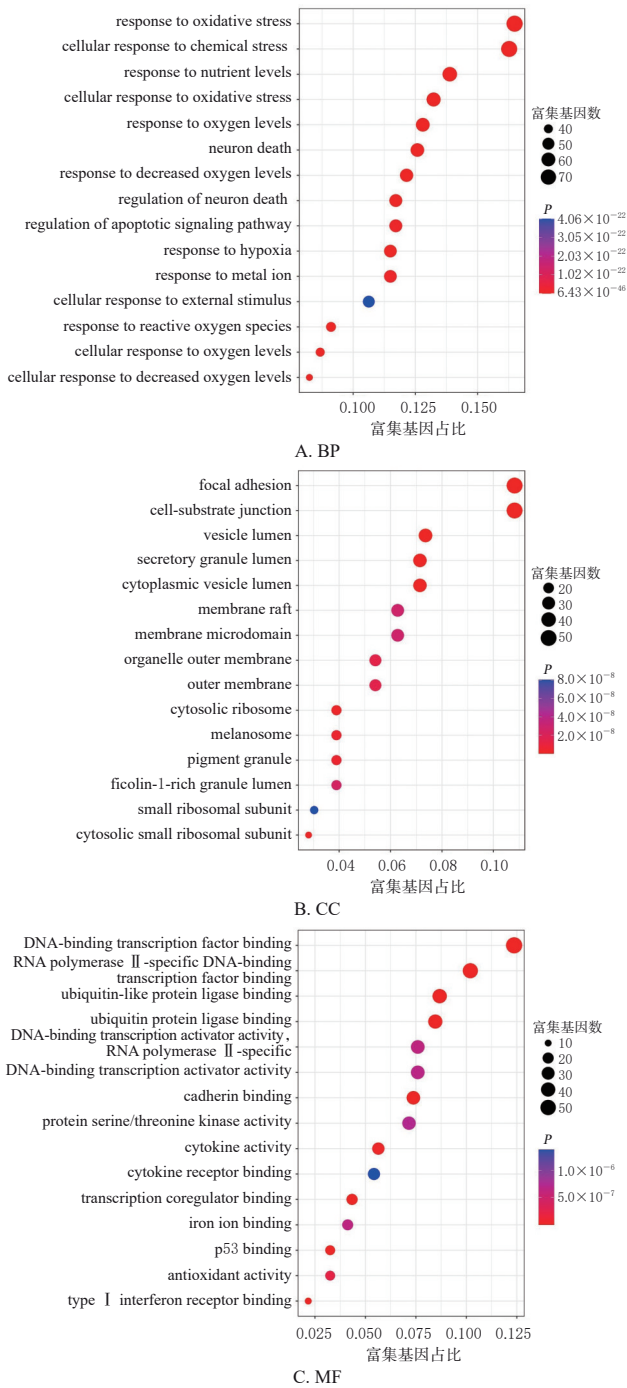


图1 VTM干预GBM的GO功能富集结果气泡图(富集基因占比排名前15位)

## 2.2 体外细胞实验

### 2.2.1 细胞培养

将U251细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养,隔天换液传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

### 2.2.2 细胞存活率检测

采用CCK-8法进行检测。取对数生长期的U251细胞,按5 000个/孔接种于96孔板中,按“2.2.1”项下方法常规培养过夜。将细胞分为对照组(VTM 0 μmol/L)和VTM不同浓度组(40、60、80、100、120、140 μmol/L,浓度

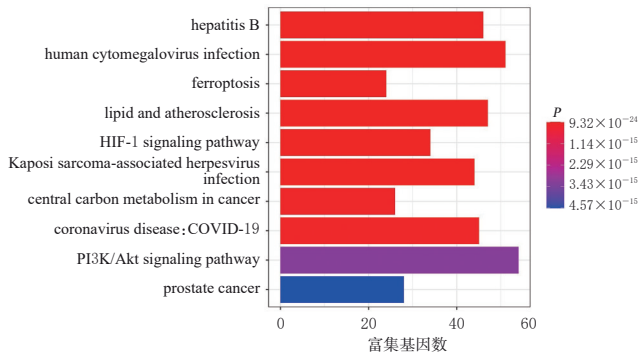


图2 VTM干预GBM的KEGG富集结果柱状图(富集基因占比排名前10位)

参考相关文献<sup>[4]</sup>设置),并设置不加药物、不加细胞的空白组,每组设3个复孔。培养24 h后,每孔加入CCK-8工作液10 μL,孵育1 h。使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值并按下式计算细胞存活率:细胞存活率=(OD<sub>实验组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)/(OD<sub>对照组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)×100%。采用GraphPad Prism 8.3.0软件对数据进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ (统计方法下同)。结果(图3)显示,与对照组比较,VTM各浓度组的细胞存活率均显著降低( $P<0.01$ ),且有一定的浓度依赖趋势。

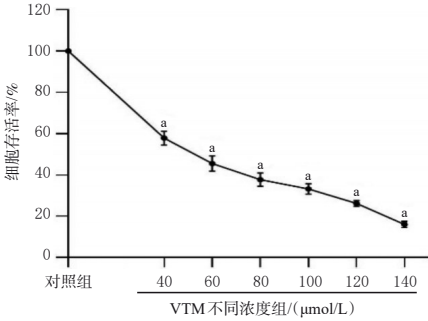
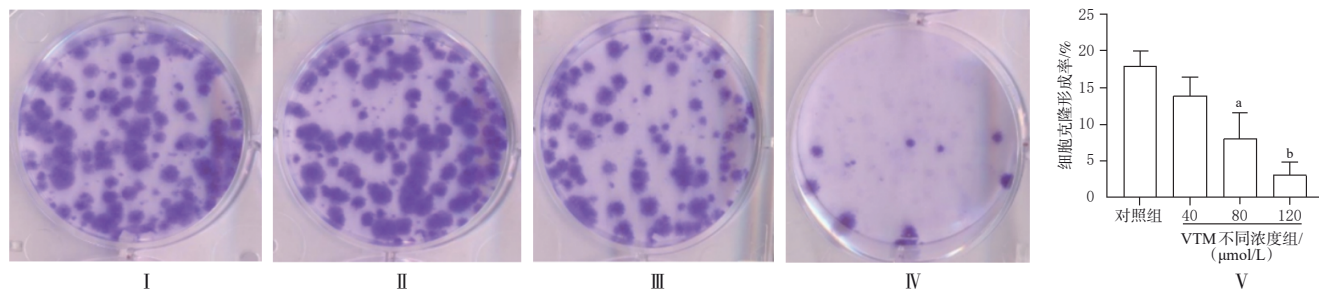


图3 不同浓度VTM对U251细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

### 2.2.3 细胞克隆形成能力检测

采用细胞克隆形成实验进行检测。取对数生长期的U251细胞,按500个/孔接种于6孔板中,常规培养过夜。将细胞分为对照组和VTM不同浓度组(40、80、120 μmol/L,浓度参考“2.2.2”项下实验结果设置),每组设3个复孔。培养24 h后,弃去培养基,加入新鲜培养基,培养14 d;弃去培养基,细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,置于4%多聚甲醛固定液中固定20 min,随后用0.1%结晶紫染色液染色30 min,用PBS洗涤后自然干燥,拍照并观察细胞克隆形成情况,按下式计算细胞克隆形成率:细胞克隆形成率=集落形成数/每孔细胞总数×100%(细胞数>50为1个集落)。结果(图4)显示,80、120 μmol/L的VTM均可显著抑制U251细胞的克隆形成( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。



I:对照组的细胞克隆形成图;II:VTM 40  $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞克隆形成图;III:VTM 80  $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞克隆形成图;IV:VTM 120  $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞克隆形成图;V:各组细胞克隆形成率柱形图;a:与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与对照组比较, $P<0.01$ 。

图4 VTM对U251细胞克隆形成能力的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

#### 2.2.4 细胞形态变化观察

取对数生长期的U251细胞,按 $1.5 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,常规培养过夜。细胞按“2.2.3”项下方法进行分组、处理。培养24 h后,使用倒置显微镜观察各组细胞的形态变化。结果(图5)显示,相较于对照组细胞,VTM各浓度组细胞的排列明显更为松散,可见细胞明显萎缩,并伴有大量漂浮的死亡细胞,且VTM作用浓度越大,其对细胞形态的影响越明显。

#### 2.2.5 细胞内ROS水平检测

采用DCFH-DA荧光探针法进行检测。取对数生长期的U251细胞,按 $1.5 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,常规培养过夜。细胞按“2.2.3”项下方法进行分组、处理。培养24 h后,弃去培养液,细胞用PBS洗涤3次后,加入DCFH-DA荧光探针(10  $\mu\text{mol/L}$ ),常规孵育30 min;用PBS洗涤3次后,置于荧光显微镜下观察各孔的荧光(绿色)变化情况并使用Image J软件计算其荧光相对强度,用以表示细胞内ROS水平。结果(图6)显示,与对照组比较,VTM各浓度组细胞内的绿色荧光均有所增强,其ROS水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),有一定的浓度依赖趋势。

#### 2.2.6 细胞内 $\text{Fe}^{2+}$ 水平检测

采用FerroOrange荧光探针法进行检测。取对数生

长期的U251细胞,按 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,常规培养过夜。细胞按“2.2.3”项下方法进行分组、处理。培养24 h后,弃去培养液,细胞用无血清培养基洗涤3次后,加入FerroOrange荧光探针(1  $\mu\text{mol/L}$ ),常规孵育30 min后,置于荧光显微镜下观察各孔的荧光(红色)变化情况并使用Image J软件计算其相对荧光强度,用以表示细胞内 $\text{Fe}^{2+}$ 水平。结果(图7)显示,与对照组比较,VTM各浓度组细胞内的红色荧光均有所增强,其 $\text{Fe}^{2+}$ 水平均显著升高( $P<0.01$ ),有一定的浓度依赖趋势。

#### 2.2.7 细胞内铁死亡通路Nrf2/HO-1/GPX4相关蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的U251细胞,按 $2 \times 10^6$ 个/皿接种于100 mm培养皿中,常规培养过夜。细胞按“2.2.3”项下方法进行分组、处理。培养24 h后,裂解提取全细胞蛋白并以BCA法测定蛋白浓度。取变性后的蛋白样品适量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h;以TBST缓冲液洗膜后,加入Nrf2、HO-1、GPX4、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),于4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;以TBST缓冲液洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),于37  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h;以TBST缓冲液洗膜后,用ECL显影液显色,于化学

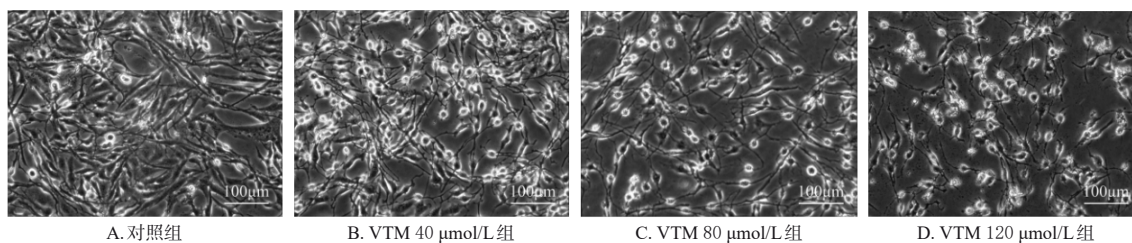
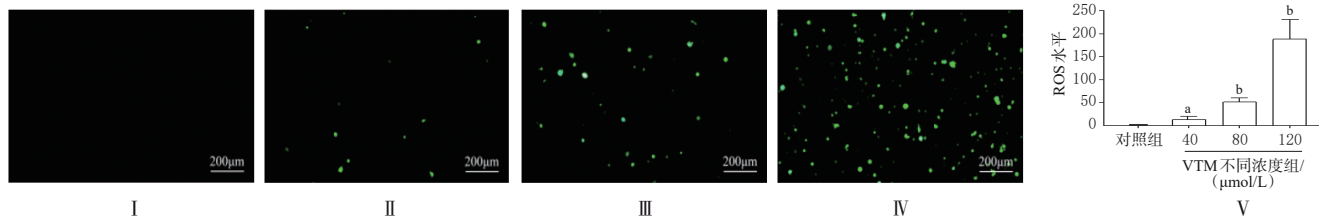
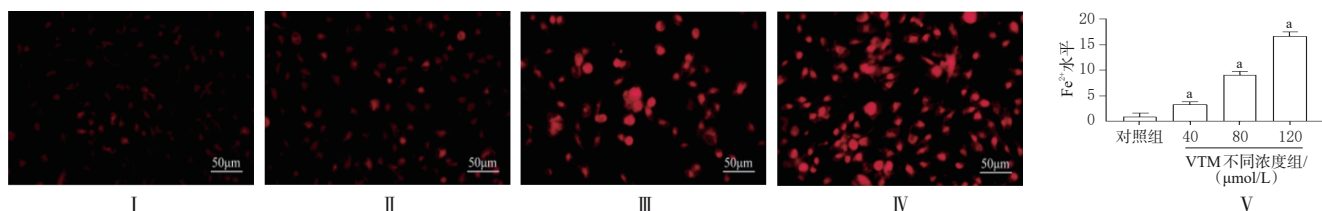


图5 VTM对U251细胞形态影响的显微图



I:对照组的ROS表达荧光图;II:VTM 40  $\mu\text{mol/L}$ 组的ROS表达荧光图;III:VTM 80  $\mu\text{mol/L}$ 组的ROS表达荧光图;IV:VTM 120  $\mu\text{mol/L}$ 组的ROS表达荧光图;V:各组细胞的ROS水平柱形图;a:与对照组比较, $P<0.05$ ;b:与对照组比较, $P<0.01$ 。

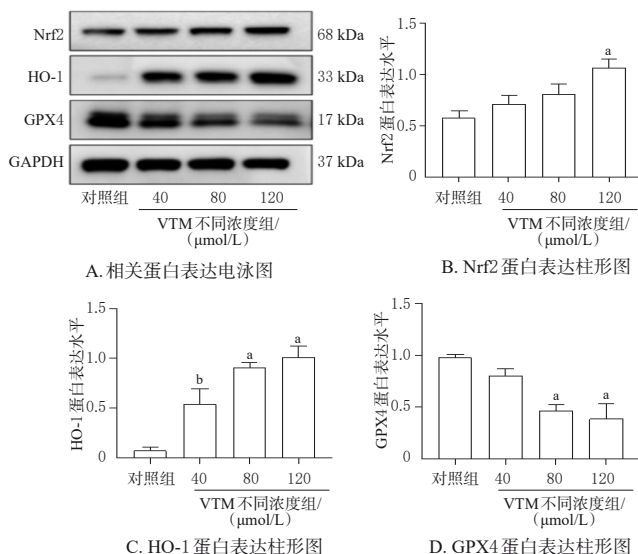
图6 VTM对U251细胞内ROS水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



I:对照组的Fe<sup>2+</sup>荧光显微图;II:VTM 40 μmol/L组的Fe<sup>2+</sup>荧光显微图;III:VTM 80 μmol/L组的Fe<sup>2+</sup>荧光显微图;IV:VTM 120 μmol/L组的Fe<sup>2+</sup>荧光显微图;V:各组细胞的Fe<sup>2+</sup>水平柱形图;a:与对照组比较, $P<0.01$ 。

图7 VTM对U251细胞内Fe<sup>2+</sup>水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

发光成像系统下曝光成像。使用Image J软件进行分析,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值作为各目的蛋白的表达水平。结果(图8)显示,与对照组比较,VTM 80、120 μmol/L组细胞内GPX4蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.01$ ),VTM 120 μmol/L组细胞内Nrf2蛋白和VTM各浓度组细胞内HO-1蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),上述作用有一定的浓度依赖趋势。



a:与对照组比较, $P<0.01$ ;b:与对照组比较, $P<0.05$ 。

图8 VTM对U251细胞内铁死亡通路相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

GBM是恶性程度高、侵袭性强、致死率高的中枢神经系统恶性肿瘤,严重影响患者的生存质量<sup>[1]</sup>。考虑到现有疗法的局限性,挖掘靶向抑制GBM细胞增殖的药物对改善患者预后具有重要的临床意义。

本研究在前期预实验基础上,首先借助网络药理学手段,筛选得到了VTM干预GBM的铁死亡相关交集靶点462个;随后的GO功能富集结果显示,VTM干预GBM的CC包括胞质囊泡、线粒体膜等,MF涉及Fe<sup>2+</sup>结合、DNA转录过程等,BP以氧化应激、细胞凋亡等为主;进一步的KEGG富集结果显示,VTM干预GBM的作用靶点分布于铁死亡、PI3K/Akt等信号通路。上述结果提示,VTM对GBM的干预作用可能是通过激活氧化应激、铁死亡等信号通路来实现的。基于此推测,本研究

结合交集靶点分析及铁死亡相关研究结果<sup>[6-9]</sup>,选取Nrf2/HO-1/GPX4信号通路进行初步验证。

本研究通过CCK-8法、细胞克隆形成实验、细胞形态变化观察发现,不同浓度的VTM可不同程度地抑制U251细胞的增殖和克隆形成,并可造成细胞萎缩、细胞核破碎等,上述作用有一定的浓度依赖趋势,初步确定了VTM对U251细胞活性的抑制作用。研究指出,铁死亡不仅是GBM细胞程序性死亡过程中的主要类型<sup>[7]</sup>,而且可影响脑胶质瘤患者的药物治疗效果及预后,还可影响神经退行性疾病的病理过程<sup>[8-9]</sup>,提示铁死亡可作为神经肿瘤、神经系统疾病治疗和新药研发的关键靶点。作为一种细胞死亡方式,铁死亡与其他死亡方式的区别在于,铁死亡涉及了铁代谢和脂质ROS蓄积的过程,Fe<sup>2+</sup>可通过芬顿反应来诱导细胞内ROS的蓄积,从而诱导铁死亡的发生<sup>[5]</sup>。为了验证VTM能否通过铁死亡来抑制GBM细胞活性,本研究采用DCFH-DA和FerroOrange荧光探针法分别检测了VTM作用后细胞内ROS和Fe<sup>2+</sup>水平,结果显示,二者荧光强度均明显增强,提示VTM可诱导细胞内ROS和Fe<sup>2+</sup>的蓄积,且有浓度依赖趋势。

近期多项研究表明,Nrf2/HO-1/GPX4信号通路与铁死亡通路调控密切相关。其中,Nrf2/HO-1是抗氧化系统的主要调控因子,同时也在涉及铁死亡的铁代谢、脂质代谢等过程中发挥了重要作用<sup>[10-13]</sup>。研究指出,作为调节氧化还原稳态的重要蛋白,Nrf2的异常表达可导致脂质氧化及铁死亡的发生<sup>[14]</sup>;同时,Nrf2可在上游调节HO-1蛋白的表达,以启动对细胞的保护作用,可通过调控GPX4蛋白的表达,进而影响细胞铁死亡进程<sup>[15]</sup>。此外,作为细胞抗氧化活性的重要调节因子,Nrf2还具有一定的双重作用:在正常情况下,该蛋白的表达水平较低,被激活后可抑制肿瘤的形成;在病理条件下,Nrf2能促进肿瘤细胞的增殖及转移,减轻化疗药物导致的氧化应激损伤,阻止肿瘤细胞凋亡、自噬并促进耐药,从而影响患者预后<sup>[16-17]</sup>。有研究发现,Nrf2在高级别胶质瘤细胞中有更高的表达,可作为胶质瘤病理分析的标志物<sup>[18]</sup>。GPX4是一种启动内源性抗氧化反应元件的转录因子,也是铁死亡的重要调节因子,可保护细胞免受ROS蓄积所致的氧化损伤,维持细胞脂质稳态;当GPX4表达被抑制时,脂质过氧化物将不断蓄积,并进一步诱导铁死亡的发生<sup>[10-13]</sup>。与正常神经胶质细胞相比,人GBM细胞(U251和U87)中GPX4蛋白的表达水平更高,且该蛋白对铁死亡诱导剂的敏感性更强<sup>[19]</sup>。可见,

靶向调控 GPX4 蛋白的表达可能是 GBM 治疗的有效手段,GPX4 蛋白可作为潜在的肿瘤标志物。本研究的 Western blot 实验结果显示,与对照组比较,VTM 80、120  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内 GPX4 蛋白的表达水平均显著降低,VTM 120  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内 Nrf2 蛋白和 VTM 各浓度组细胞内 HO-1 蛋白的表达水平均显著升高,提示 VTM 可通过调控 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路来诱导 U251 细胞铁死亡。

笔者通过查阅近期研究发现,Nrf2、HO-1 蛋白对于靶向铁死亡治疗肿瘤具有关键作用,即抑制 Nrf2 蛋白的过表达,可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,逆转肿瘤细胞的耐药,促进细胞铁死亡的发生<sup>[20]</sup>;同时,HO-1 蛋白可通过铁蓄积等途径来促进铁死亡的发生<sup>[21-22]</sup>。然而,VTM 能否通过干预 Nrf2、HO-1 蛋白的过表达来影响铁死亡的过程尚需后续实验探讨。

综上所述,VTM 可抑制人 GBM 细胞 U251 的增殖,促进细胞内 ROS 和  $\text{Fe}^{2+}$  的蓄积,从而诱导铁死亡,上述作用可能与调控 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路有关;VTM 可作为一种潜在的铁死亡诱导剂。本课题组后续将进一步结合通路抑制剂、小分子 RNA 干扰等方式并基于本网络药理学提示的自噬、凋亡等其他通路来完善对 VTM 干预 GBM 作用机制的探索。

## 参考文献

- [1] LAH T T,NOVAK M,BREZNIK B. Brain malignancies: glioblastoma and brain metastases[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020,60:262-273.
- [2] TAN A C,ASHLEY D M,LÓPEZ G Y, et al. Management of glioblastoma: state of the art and future directions [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020,70(4):299-312.
- [3] YIN L L,XIA Y H,XU P, et al. Veratramine suppresses human HepG2 liver cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by inducing autophagic cell death[J]. *Oncol Rep*, 2020,44(2):477-486.
- [4] KIM D,KWON W,PARK S, et al. Anticancer effects of veratramine via the phosphatidylinositol-3-kinase/serine-threonine kinase/mechanistic target of rapamycin and its downstream signaling pathways in human glioblastoma cell lines[J]. *Life Sci*, 2022,288:120170.
- [5] 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.
- [6] 关锡梅,解勇圣,倪伟建,等. Nrf2/HO-1/GPX4 对高糖诱导足细胞铁死亡的影响及小檗碱的干预机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2021,37(3):396-403.  
GUAN X M,XIE Y S,NI W J, et al. Influence of Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway on high glucose-induced podocyte ferroptosis and intervention of berberine[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021,37(3):396-403.
- [7] LIU T Q,ZHU C,CHEN X, et al. Ferroptosis, as the most enriched programmed cell death process in glioma, induces immunosuppression and immunotherapy resistance

- [J]. *Neuro Oncol*, 2022,24(7):1113-1125.
- [8] 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):273-285.
- [9] QIU Y M,CAO Y,CAO W J, et al. The application of ferroptosis in diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2020,159:104919.
- [10] SUN X,ZHANG X Y,YAN H, et al. Protective effect of curcumin on hepatolenticular degeneration through copper excretion and inhibition of ferroptosis[J]. *Phytomedicine*, 2023,113:154539.
- [11] KAJARABILLE N,LATUNDE-DADA G O. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(19):4968.
- [12] YANG W C,WANG Y X,ZHANG C G, et al. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation[J]. *Front Pharmacol*, 2022,13:865689.
- [13] DANG R Z,WANG M Y,LI X H, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2022,19(1):41.
- [14] ZHANG X Y,HUANG Z B,XIE Z A, et al. Homocysteine induces oxidative stress and ferroptosis of nucleus pulposus via enhancing methylation of GPX4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020,160:552-565.
- [15] DODSON M,CASTRO-PORTUGUEZ R,ZHANG D D. NRF<sub>2</sub> plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019,23:101107.
- [16] NITTI M,IVALDO C,TRAVERSO N, et al. Clinical significance of heme oxygenase 1 in tumor progression[J]. *Antioxidants*, 2021,10(5):789.
- [17] LI B,NASSER M I,MASOOD M, et al. Efficiency of traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2020,126:110074.
- [18] TSAI W C,HUENG D Y,LIN C R, et al. Nrf2 expressions correlate with WHO grades in gliomas and meningiomas[J]. *Int J Mol Sci*, 2016,17(5):722.
- [19] TAN S G,HOU X Q,MEI L. Dihydrotanshinone I inhibits human glioma cell proliferation via the activation of ferroptosis[J]. *Oncol Lett*, 2020,20(4):122.
- [20] SUN X F,OU Z H,CHEN R C, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF<sub>2</sub> pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2016,63(1):173-184.
- [21] CHANG L C,CHIANG S K,CHEN S E, et al. Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis[J]. *Cancer Lett*, 2018,416:124-137.
- [22] MENON A V,LIU J, TSAI H P, et al. Excess heme up-regulates heme oxygenase 1 and promotes cardiac ferroptosis in mice with sickle cell disease[J]. *Blood*, 2022,139(6):936-941.

(收稿日期:2023-04-20 修回日期:2023-09-12)

(编辑:张元媛)