

## • 实验研究 •

## 过氧麦角甾醇衍生物抑制微管蛋白聚合与硫氧还蛋白还原酶抗肺癌 A549 细胞作用机制研究

林 强, 薛龙辉, 赵音旭, 侯丽曼, 罗 然, 徐天赐, 林 宇, 卜 明<sup>\*1</sup>

齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

**摘 要:** 目的 以过氧麦角甾醇为先导化合物, 基于分子杂合思想设计合成新型过氧麦角甾醇-3-(3,4,5-三甲氧基苯基)-丙烯酸酯 (EP-TTB) 并探究其对肺癌 A549 细胞的作用机制。方法 通过酯化反应合成目标化合物 EP-TTB, 采用 MTT 法检测不同浓度 (0、2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) EP-TTB 作用于 A549 细胞后增殖抑制情况。将细胞分为对照组, EP-TTB (1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及过氧麦角甾醇 4  $\mu\text{mol/L}$  组, 采用流式细胞术检测细胞凋亡率、活性氧 (ROS) 水平、线粒体膜电位变化 (JC-1) 以及细胞周期分布; 采用微管绿色荧光染色试剂盒进行染色, 通过激光共聚焦观察细胞核状态; 采用 Western blotting 法检测 A549 细胞 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cyt-C)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、p-PI3K、p-AKT、 $\beta$ -tubulin 及 TrxR 的蛋白表达水平。结果 EP-TTB 的细胞毒活性显著优于过氧麦角甾醇。EP-TTB 可显著降低 A549 细胞增殖率 ( $P < 0.01$ 、0.001); 细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  期。与对照组相比, EP-TTB 组细胞凋亡率明显增加; ROS 水平明显升高; 线粒体膜电位明显升高; Bax、Cyt-C 蛋白表达显著上调, p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、 $\beta$ -tubulin、TrxR 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.01$ 、0.001)。结论 EP-TTB 能同时靶向微管蛋白与硫氧还蛋白还原酶, 从而有效抑制肺癌细胞增殖、诱导其凋亡, 揭示其双靶点抗肿瘤作用机制。

**关键词:** 过氧麦角甾醇; 肺癌; 硫氧还蛋白还原酶; 微管蛋白; 活性氧; 细胞 B 淋巴细胞瘤-2

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2026)01-0001-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.01.001

## Mechanistic of ergosterol peroxide derivatives against lung cancer A549 cells through dual inhibition of tubulin polymerization and thioredoxin reductase

LIN Qiang, XUE Longhui, ZHAO Yinxu, HOU Liman, LUO Ran, XU Tianci, LIN Yu, BU Ming

College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China

**Abstract: Objective** To design and synthesize a novel peroxide ergosterol-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-propionic acid ester derivative (EP-TTB) based on the concept of molecular heterogeneity, and to investigate its mechanism of action on lung cancer A549 cells. **Methods** The target compound EP-TTB was synthesized through esterification reaction. The proliferation inhibition of different concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$ ) of EP-TTB on A549 cells was detected by MTT assay. The cells were divided into control group, EP-TTB (1, 2, 4  $\mu\text{mol/L}$ ) group and peroxide ergosterol 4  $\mu\text{mol/L}$  group. The apoptosis rate, ROS level, mitochondrial membrane potential change (JC-1), and cell cycle distribution of the cells were detected by flow cytometry. The cell nucleus state was observed by green fluorescent staining with the microtubule staining kit and laser confocal microscopy. The protein expression levels of Bcl-2, Bax, Cyt-C, PI3K, Akt, p-PI3K, p-AKT,  $\beta$ -tubulin, and TrxR in A549 cells were detected by Western blotting. **Results** The cytotoxic activity of EP-TTB was significantly superior to that of peroxide ergosterol. EP-TTB significantly reduced the proliferation rate of A549 cells ( $P < 0.01$ , 0.001), the cell cycle was arrested in  $G_0/G_1$  phase. Compared with the control group, the apoptosis rate of the EP-TTB group was significantly increased; the ROS level was significantly elevated; the mitochondrial membrane potential was significantly increased; the protein expression of Bax and Cyt-C was significantly upregulated, and the protein expression of Bcl-2,  $\beta$ -

收稿日期: 2025-11-26

基金项目: 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目 (2024-KYYWF-0342)

作者简介: 林 强, 硕士研究生。E-mail: 19060528721@163.com

\*通信作者: 卜 明, 博士, 教授, 主要从事天然药物抗肿瘤作用研究。E-mail: buming@qmu.edu.cn

tubulin, TrxR, p-PI3K, p-Akt, and p-PI3K was significantly downregulated ( $P < 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** EP-TTB can simultaneously target tubulin and thioredoxin reductase, thereby effectively inhibiting the proliferation of lung cancer cells and inducing their apoptosis. This preliminary study reveals its dual-target anti-tumor mechanism.

**Key words:** ergosterol peroxide; lung cancer; thioredoxin reductase; tubulin polymerase; ROS; Bcl-2

根据世界卫生组织 2024 年公布的全球癌症负担报告,肺癌已经连续 10 年成为全球癌症死亡率的“榜首”。此外,非小细胞肺癌患者约占比肺癌总人数的 85%<sup>[1]</sup>。因此,开发新型高效低毒、选择性好的抗肺癌靶向药物是肺癌治疗研究的主攻方向。中药资源是蕴含抗肿瘤活性化合物的天然宝库,亦是发掘新一代抗肺癌先导结构的重要源泉<sup>[2]</sup>。

过氧麦角甾醇是一种广泛存在于真菌、海绵、藻类中的天然内过氧化甾体化合物<sup>[3-5]</sup>。过氧麦角甾醇具有广谱的抗肿瘤、抗菌、抗炎活性<sup>[6-8]</sup>。近年来文献报道其对肺癌具有显著抑制作用,如 Wu 等<sup>[9]</sup>研究指出过氧麦角甾醇能够通过活性氧(ROS)依赖性诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡和自噬。任文康等<sup>[10]</sup>通过网络药理学及体外验证实验发现过氧麦角甾醇能通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B1(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路介导线粒体导致 A549 细胞凋亡。近年来,文献报道以过氧麦角甾醇作为先导化合物的结构修饰研究,获得多个具有潜在肺癌新药研究价值的过氧麦角甾醇新结构<sup>[11-13]</sup>。

微管蛋白是构成细胞内微管的基本结构单元,参与调控多种重要的细胞生理功能。维持微管系统的动态平衡对于实现包括细胞分裂在内的多项细胞功能至关重要。微管网的重构是细胞生命周期及正常分裂的必要条件。已有研究表明,微管排列的紊乱或数量的异常变化与肿瘤的恶性增殖密切相关<sup>[14-15]</sup>;破坏由微管组成的细胞骨架可导致血管内皮细胞解体,进而引起肿瘤组织缺血坏死<sup>[16-17]</sup>。因此,微管蛋白已成为抗肿瘤药物研发中的一个重要靶点<sup>[18]</sup>。目前,已有多种靶向微管蛋白的抑制剂被开发出来。其中,康普瑞 A4 是从南非灌木 *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze 中分离得到的天然产物,是迄今已知活性最强的微管蛋白抑制剂之一<sup>[19-20]</sup>。秋水仙碱则能特异性结合微管蛋白,抑制其聚合成微管<sup>[21]</sup>。结构分析显示,3,4,5-三甲氧基苯基是该类药物中常见的活性优势片段。此外,含有  $\alpha,\beta$ -不饱和酮结构的查尔酮类化合物也表现出较强的微管蛋白抑制活性<sup>[22]</sup>。

ROS 是细胞代谢的常见副产物,癌细胞依赖抗氧化系统以维持氧化还原稳态<sup>[23]</sup>,这种依赖性使其对氧化还原系统异常敏感,相关调控机制已成为抗癌药物研发的重要方向<sup>[24-26]</sup>。硫氧还蛋白(Trx)系统是维持该平衡的核心,其关键组分硫氧还蛋白还原酶(TrxR)在肿瘤中高表达。抑制 TrxR 可破坏该系统功能,导致 ROS 蓄积与氧化还原失衡<sup>[27]</sup>。天然产物茛菪酰胺能选择性抑制 TrxR1 活性,通过增加 ROS 水平诱导肿瘤细胞死亡<sup>[28]</sup>,其结构中的  $\alpha,\beta$ -不饱和酮和 3,4,5-三甲氧基苯基片段亦常见于微管蛋白抑制剂<sup>[29]</sup>。

为进一步提升先导化合物过氧麦角甾醇的抗肺癌活性与靶向性,本研究基于分子杂合思想,提取上述天然产物结构的优势片段,将  $\alpha,\beta$ -不饱和酮和 3,4,5-三甲氧基苯基片段与过氧麦角甾醇进行结合(图 1),旨在获得可同时干预微管动力学与 TrxR 功能的新型抗肺癌分子。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人肺癌细胞系 A549 细胞(批号 SCSP-510)、人胚肺细胞 MRC-5(批号 SNL-018)均购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 药品与试剂

过氧麦角甾醇由齐齐哈尔医学院药学院药物化学研究室提供,质量分数 > 98%;秋水仙碱(C3915-500MG)购自 Merck Millipore;顺铂(C14330-100mg)购自上海吉至生化科技有限公司。3-(3,4,5-三甲氧基苯基)丙烯酸(批号 A010761)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDCI,批号 A070109)、4-二甲氨基吡啶(DMAP,批号 8.51055)购自安徽泽升科技股份有限公司;高糖 DMEM 培养基(批号 OMDCM-004)购自欧玛仕(上海)生物科技有限公司;胎牛血清(批号 OMD-72503)购自欧玛仕(上海)生物科技有限公司;MTT 试剂盒(批号 M1020-500T)购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(批号 40302ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;JC-1 试剂盒(批号 E-CK-A301)购自武汉伊莱

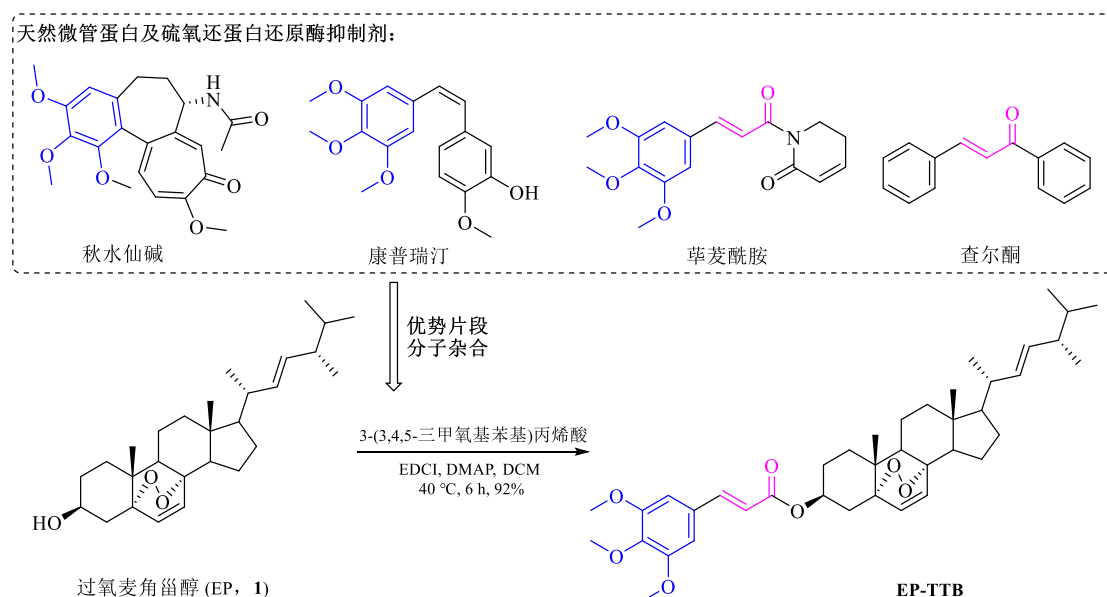


图 1 EP-TTB 的结构设计策略及合成路线

Fig. 1 Structural design strategy and synthetic route of compound EP-TTB

瑞特生物科技股份有限公司; ROS 检测试剂盒 (批号 J21799) 购自武汉吉立德科技有限公司; BCA 试剂盒 (批号 A55860) 购自赛默飞世尔科技公司; RIPA 裂解液 (批号 89900) 购自赛默飞世尔科技公司; 微管蛋白  $\beta$ -tubulin 抗体 (批号 T0198) 购自默克公司; B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗体 (批号 FNa00839) 购自武汉菲恩生物科技股份有限公司; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (批号 ab32503) 购自 Abcam plc; 细胞色素 C (Cyt-C) 抗体 (批号 ab133504) 购自 Abcam plc; p-PI3K 抗体 (批号 4228S) 美国 Cell Signaling Technology 公司; 硫氧还蛋白还原酶 (TrxR) 抗体 (批号 sc-28321) 购自上海圣克鲁斯生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 G6019-100UN)、Akt 抗体 (批号 07-383)、p-Akt 抗体 (批号 07-888)、PI3K 抗体 (批号 SAB5500162) 购自德国默克密理博公司; 山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 LF102) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 超敏 ECL 显色试剂盒 (批号 P10300) 购自苏州新赛美生物科技有限公司; 微管绿色荧光染色试剂盒 (批号 C2213S)。微管蛋白聚合评价试剂盒 (批号 CD-101400GM) 购自武汉纯度生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

DF-101S 型恒温加热磁力搅拌器[艾卡 (广州) 仪器设备有限公司]、EYELAN-1300 型旋转蒸发仪[埃朗科技国际贸易 (上海) 有限公司]、Bruker

Avance DRX400 型核磁共振仪[布鲁克 (美国) 公司]、Bruker Esquire 6000 型质谱仪[布鲁克 (美国) 公司]。Heracell™ VIOS 160i CR CO<sub>2</sub> 培养箱 (赛默飞世尔科技公司); Multiskan™ FC 酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); PowerPac 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); WB-600Auto 全自动蛋白印迹成像仪 (广州博鹭腾生物科技有限公司); LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

## 2 方法

### 2.1 化合物 EP-TTB 的合成

过氧麦角甾醇 (428 mg, 1.0 mmol)、3,4,5-三甲氧基苯基丙烯酸 (315 mg, 1.2 mmol)、EDCI (288 mg, 1.1 mmol) 作为缩合剂, DMAP (122 mg, 1.0 mmol) 作为催化剂, 100 mL 二氯甲烷作溶剂, 在 40 °C 下反应 6 h, TLC 监测反应进程。反应结束后, 硅胶柱色谱分离纯化, 得到目标化合物过氧麦角甾醇-3-(3,4,5-三甲氧基苯基)-丙烯酸酯 (EP-TTB) 596 mg。

### 2.2 细胞培养

A549、MRC-5 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温细胞培养箱中培养。

### 2.3 MTT 检测细胞活力

在 96 孔板中分别接种对数生长期的 A549 细胞, 每孔接种密度为  $3 \times 10^3$  个细胞。待细胞完全贴

壁后移除原有培养基。实验设置包括对照组、EP-TTB (2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  相应浓度的含药培养基, 对照组则加入等体积的 DMEM 培养基, 分别处理 24、48、72 h 后, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液, 避光孵育 4 h。随后移除培养液, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 振荡 10 min。使用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度 ( $A$ ) 值, 并计算细胞增殖抑制率。另分别设置 EP-TTB (2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、秋水仙碱 (2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、顺铂 (2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组及母体化合物过氧麦角甾醇 (2.5、5、10、20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组作为对照, 采用 SPSS 25.0 软件分析数据, 计算 EP-TTB 对 A549 细胞的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。使用人胚肺成纤维细胞 MRC-5 代替 A549 评估化合物的选择性指数 (SI)。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

$$\text{SI} = \text{MRC-5 细胞 } \text{IC}_{50} / \text{A549 细胞 } \text{IC}_{50}$$

## 2.4 细胞凋亡情况检测

将 A549 细胞消化并计数, 按每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种在 6 孔板中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 至完全贴壁。设置对照组、EP-TTB (1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、过氧麦角甾醇 (4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 作用 48 h 弃去含药培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤 1 次, 用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰酶消化, 收集至 1.5 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 3 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 每个样品中加入 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液、5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶、5  $\mu\text{L}$  异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (Annexin V-FITC), 在室温中避光孵育 20 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 数据用 Flowj 10.8.1 进行处理。

## 2.5 细胞周期检测

A549 细胞培养及接种方式同 2.4 项下。设置对照组、EP-TTB (1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、过氧麦角甾醇 (4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 作用 48 h 弃去含药培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤 1 次, 用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰酶消化, 收集至 1.5 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 3 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 细胞沉淀中加入 500  $\mu\text{L}$  预冷的 70% 乙醇, 吹打混匀,  $-20^{\circ}\text{C}$  固定 2 h, 取出固定好的细胞, 2 000 r/min 离心 3 min, 每个样品加入 500  $\mu\text{L}$  染色工作液 (RNaseA-PI 1:9), 室温孵育避光 30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期分布, 数据用 Flowj 10.8.1 进行处理。

## 2.6 细胞线粒体膜电位检测

按 2.4 项下方法分组处理 A549 细胞。设置对照组、EP-TTB (1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、过氧麦角甾醇 (4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 使用 PBS 洗涤细胞 2 次, 参考 JC-1 试剂盒说明书, 之后添加稀释后的 JC-1 染色液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件进行孵育, 30 min 后用  $1 \times \text{Buffer}$  洗去多余染色液, 采用流式细胞仪收集细胞, 检测线粒体膜电位的变化。数据用 Flowj 10.8.1 进行处理。

## 2.7 细胞 ROS 检测

A549 细胞培养及接种方式同 2.4 项下。设置对照组、EP-TTB (1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、过氧麦角甾醇 4  $\mu\text{mol/L}$  组, 作用 48 h 弃去含药培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤 1 次, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集至 1.5 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 3 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 每个样品中加入 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 工作液, 在培养箱中避光孵育 20 min, 弃去上清液, 用无血清培养基洗涤 2 遍, 加入 500  $\mu\text{L}$  培养基, 用流式细胞仪检测细胞 ROS 水平, 数据用 Flowj 10.8.1 进行处理。

## 2.8 Western blotting 检测相关蛋白表达

按照 2.4 项下方法进行细胞培养和分组给药。采用 RIPA 裂解液提取总蛋白后, 通过 BCA 法测定蛋白浓度并进行变性处理。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳分离后转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。随后使用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 与稀释一抗 (1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。经 TBST 洗涤后, 加入稀释二抗 (1:2 000) 室温孵育 1.5 h。最后采用 ECL 显色系统检测信号, 使用凝胶成像系统采集图像, 并通过 Image J 软件进行定量分析。

## 2.9 EP-TTB 的微管蛋白抑制作用研究

A549 细胞培养及接种方式同 2.4 项下方法。设置对照组、EP-TTB (1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、秋水仙碱 (4  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 作用 48 h 弃去含药培养基, 用 PBS 缓冲液洗涤 1 次, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集至 1.5 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 3 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次, 参照微管绿色荧光染色试剂盒说明配染色工作液, 每个空加入 300  $\mu\text{L}$  染色工作液, 在培养箱中避光孵育 20 min, 弃去上清液, 用 PBS 洗涤 3 遍, 加 DAPI 染色液室温染色 5 min, 弃去上清液, 用 PBS 洗涤 3 遍, 加入 300  $\mu\text{L}$  抗荧光淬灭剂。激光共聚焦观察细胞微管蛋白和细胞核

变化。

### 2.10 体外微管蛋白聚合试验

使用微管蛋白聚合分析试剂盒分析微管蛋白聚合过程。实验中,将 2 mg/mL 游离微管蛋白置于含有 1 mmol/L 鸟苷-5'-三磷酸和 15%甘油的缓冲体系中。随后将 EP-TTB 按相应浓度加入微管蛋白溶液中,用多功能酶标记器连续监测荧光强度 60 min,激发波长为 340 nm。实验数据用 GraphPad Prism 软件进行统计分析。

### 2.11 分子对接

从 ChemDraw 软件下载 EP-TTB 和康普瑞汀 A4 (CA-4) 的 3D 结构文件,并使用 AutoDockTools 进行分子预处理。同时,从 PDB 数据库获取目标蛋白结构,利用 PyMOL 去除其中的配体分子和水分子。随后,在 AutoDockTools 中对蛋白进行加氢和电荷计算等处理。完成分子对接后,采用 PyMOL 对结合模式进行可视化分析。

### 2.12 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间差异通过单因素方差分析判定,若有差异则进一步采用 LSD-*t* 检验两两比较。

## 3 结果

### 3.1 EP-TTB 结构表征

白色固体,产率 92%。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.60 (1H, d,  $J$  = 15.9 Hz, H-3'), 6.76 (2H, s, H-Ar), 6.54 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-7), 6.32 (1H, d,  $J$  = 15.9 Hz, H-2'), 6.27 (1H, d,  $J$  = 8.5 Hz, H-6), 5.24 (1H, dd,  $J$  = 15.2, 7.4 Hz, H-22), 5.16 (2H, dd,  $J$  = 16.9, 6.5 Hz, H-23, 3), 3.90 (9H, s, O-CH<sub>3</sub>), 2.27~2.22 (1H, m), 2.14~2.04 (4H, m), 1.98 (1H, d,  $J$  = 6.6 Hz), 1.87 (1H, d,  $J$  = 6.6 Hz), 1.76 (1H, d,  $J$  = 3.8 Hz), 1.74 (1H, d,

$J$  = 3.5 Hz), 1.62 (2H, s), 1.54 (2H, s), 1.49 (1H, d,  $J$  = 6.7 Hz), 1.43~1.36 (2H, m), 1.26 (4H, d,  $J$  = 6.5 Hz), 1.02 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz, H-18), 0.95~0.92 (6H, m, H-28, 21), 0.86~0.83 (9H, m, H-26, 27, 19)。<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 166.0, 153.4, 144.6, 140.1, 135.2, 135.1, 132.3, 131.0, 130.0, 117.7, 105.2, 81.8, 79.4, 69.6, 56.2, 56.1, 51.6, 51.1, 44.6, 42.8, 39.7, 39.3, 37.0, 34.3, 33.3, 33.1, 29.7, 28.6, 26.4, 23.4, 20.9, 20.6, 20.0, 19.6, 18.1, 17.6, 12.9。HRMS (ESI)  $m/z$ : 671.392 4 [M+Na]<sup>+</sup>, 得分子式 C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>7</sub>。

### 3.2 EP-TTB 抗肿瘤活性测试

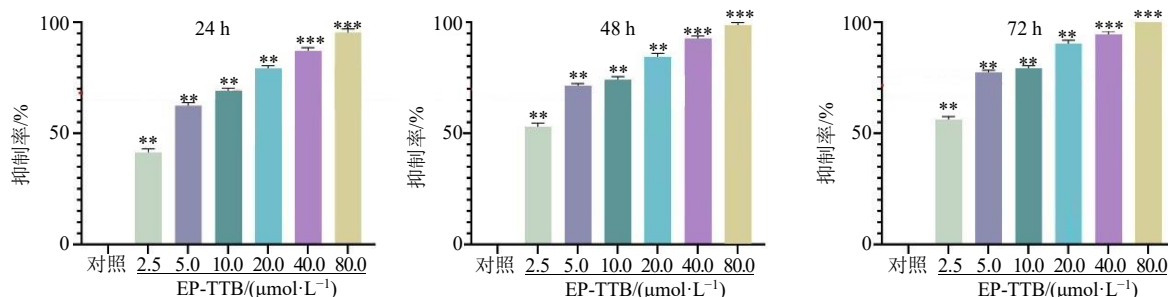
结果如图 2 所示,EP-TTB 对 A549 细胞表现出明显的细胞毒性,随着 EP-TTB 浓度增加和作用时间延长,其增殖抑制率显著上升 ( $P < 0.01$ 、0.001),与过氧麦角甾醇相比,EP-TTB 组对 A549 细胞的毒性作用增强了约 7.77 倍。由表 1 数据可知,EP-TTB 作用 48 h 的 IC<sub>50</sub> 值为 (2.27 ± 0.18)  $\mu$ mol/L。此外,通过人胚肺成纤维细胞 MRC-5 模型评估化合物的 SI,结果显示 EP-TTB 组的 SI 值为 12.4,明显高于秋水仙碱组。基于 EP-TTB 对 A549 细胞具有显著抗增殖活性及较高选择性的特点,为进一步贴近其 IC<sub>50</sub>、降低实验误差并确保结果的可重复性与稳定性,后续实验将 EP-TTB 的给药浓度设定为 1、2、4  $\mu$ mol/L。

### 3.3 EP-TTB 对 A549 细胞凋亡的影响

如图 3 所示,与对照组相比,EP-TTB 组 A549 细胞的凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001),且呈浓度相关性。以上结果说明,化合物 EP-TTB 能够浓度相关方式有效诱导 A549 细胞凋亡。

### 3.4 EP-TTB 对 A549 细胞周期的影响

采用流式细胞术检测化合物 EP-TTB 对人肺癌 A549 细胞周期的影响。结果如图 4 所示,与对照组



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 2 EP-TTB 对肺癌 A549 细胞的增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 2 Effect of EP-TTB on the proliferation inhibition rate of lung cancer A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



表 1 各组 A549 和 MRC-5 细胞 IC<sub>50</sub>、SI 比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 1 Comparison of IC<sub>50</sub> and SI values for A549 and MRC-5 cells in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

化合物	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		SI
	A549	MRC-5	
过氧麦角甾醇	17.65 $\pm$ 1.23	58.62 $\pm$ 0.32	3.32
秋水仙碱	3.85 $\pm$ 0.14	25.26 $\pm$ 1.29	6.56
顺铂	4.65 $\pm$ 0.52	—	—
EP-TTB	2.27 $\pm$ 0.18	28.32 $\pm$ 0.45	12.40

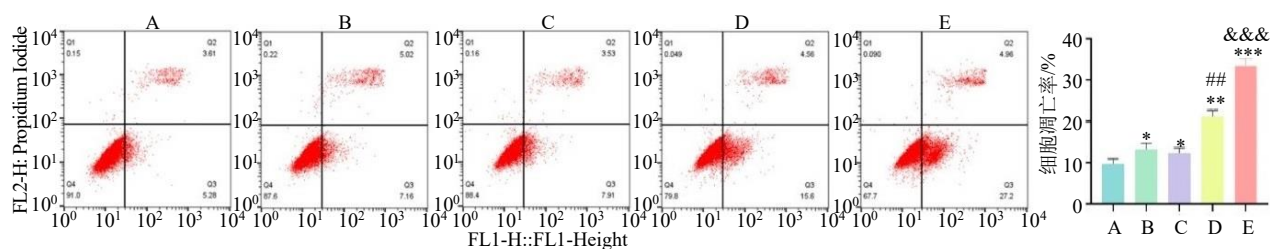
“—”表示未检测。

“—” Not tested.

相比, EP-TTB 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞比例显著增加 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001); S 期的细胞比例则有所下降, 而 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例在 EP-TTB 组变化并无显著差异。上述结果表明, EP-TTB 能够有效地将 A549 细胞阻滞在细胞周期的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 从而抑制其进入后续的 DNA 复制与分裂阶段。

### 3.5 EP-TTB 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

采用流式细胞术检测不同浓度 EP-TTB 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响, 通过 JC-1 单体比例的变化进行评估。结果如图 5 所示, 与对照组相比, EP-TTB 组细胞内 JC-1 单体比例显著升高

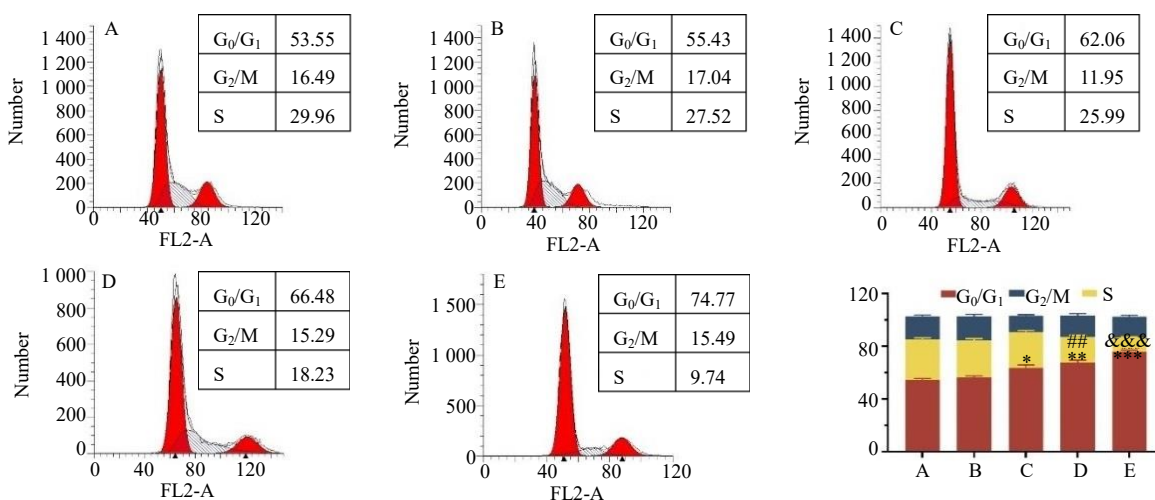


A-对照, B-过氧麦角甾醇, C-EP-TTB 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 C 组比较: ## $P < 0.01$ ; 与 D 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

A-control, B-ergosterol peroxide, C-EP-TTB 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs C group; &&& $P < 0.001$  vs D group.

图 3 EP-TTB 对 A549 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 3 Effects of EP-TTB on apoptosis of A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

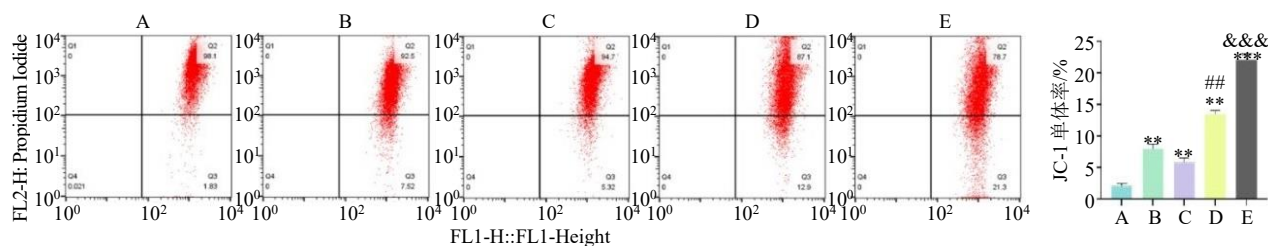


A-对照, B-过氧麦角甾醇, C-EP-TTB 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 C 组比较: ## $P < 0.01$ ; 与 D 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

A-control, B-ergosterol peroxide, C-EP-TTB 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs C group; &&& $P < 0.001$  vs D group.

图 4 化合物 EP-TTB 对 A549 细胞活性周期的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 4 Effects of EP-TTB on the cell cycle of A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



A-对照, B-过氧麦角甾醇, C-EP-TTB  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 C 组比较: ## $P < 0.01$ ; 与 D 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

A-control, B-ergosterol peroxide, C-EP-TTB  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs C group; &&& $P < 0.001$  vs D group.

图 5 EP-TTB 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

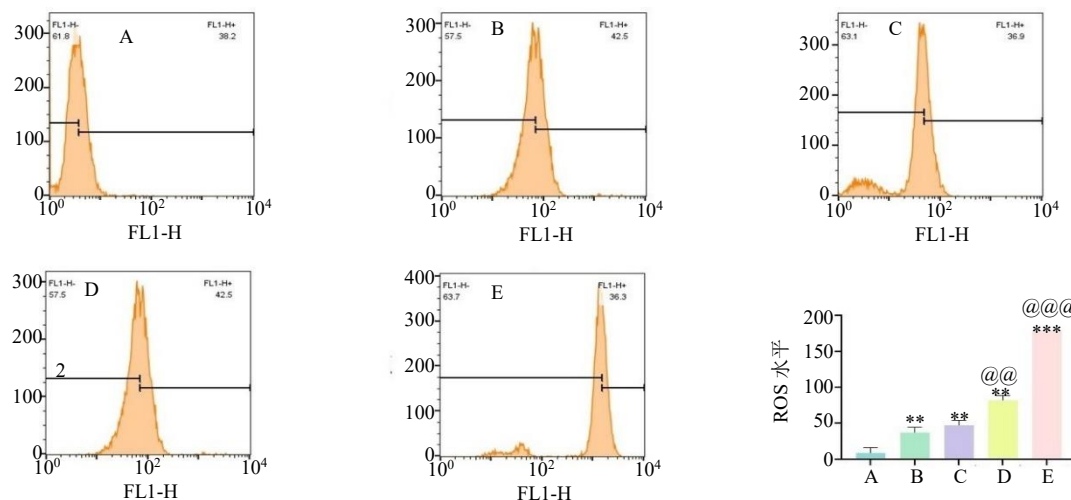
Fig. 5 Effects of EP-TTB on the mitochondrial membrane potential of A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，且呈浓度相关性。以上结果表明，EP-TTB 能够显著诱导 A549 细胞线粒体膜电位下降，且该效应呈浓度相关性增强，提示其可能通过破坏线粒体功能进而诱导细胞凋亡。

### 3.6 EP-TTB 对 A549 细胞 ROS 的影响

流式细胞术结果如图 6 显示，与对照组相比，

EP-TTB 组细胞内 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。且与过氧麦角甾醇组相比，EP-TTB 2、 $4 \mu\text{mol/L}$  组 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。以上结果提示，EP-TTB 能够有效促进 A549 细胞内 ROS 的生成，这可能是其诱导细胞凋亡的潜在机制之一。



A-对照, B-过氧麦角甾醇, C-EP-TTB  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 B 组比较: @@ $P < 0.01$  @@@ $P < 0.001$ 。

A-control, B-ergosterol peroxide, C-EP-TTB  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , D-EP-TTB  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , E-EP-TTB  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; && $P < 0.01$  &&& $P < 0.001$  vs B group.

图 6 EP-TTB 对 A549 细胞 ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 6 Effects of EP-TTB on ROS levels in A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

### 3.7 EP-TTB 对 A549 细胞线粒体凋亡蛋白表达的影响

结果如图 7 所示，与对照组相比，EP-TTB 组抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 p-PI3K 和 p-Akt 表达水平显著下降，而促凋亡蛋白 Bax 与胞浆中 Cyt-C 的表达则显著上升 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。上述结果表明，EP-TTB

可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路活化，进而调控 Bcl-2 家族蛋白平衡，促进线粒体途径的细胞凋亡。

### 3.8 EP-TTB 对微管蛋白聚合的作用

如图 8 所示，在微管蛋白聚合评价实验中，与对照组相比，EP-TTB 组的聚合速率明显减缓，最终聚合程度趋于平稳，表明该化合物能够有效抑制

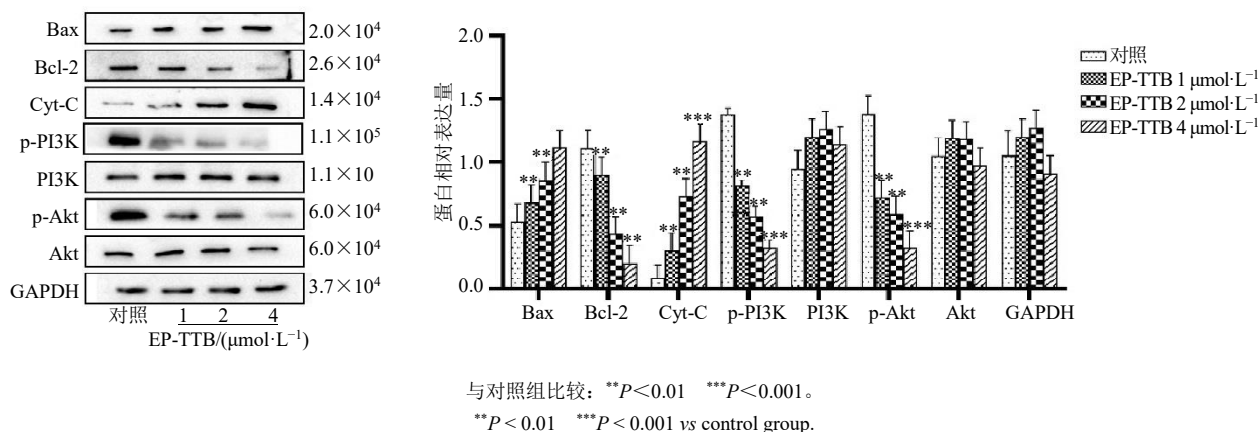


图 7 EP-TTB 对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 7 Effects of EP-TTB on the expression of apoptosis-related proteins in A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

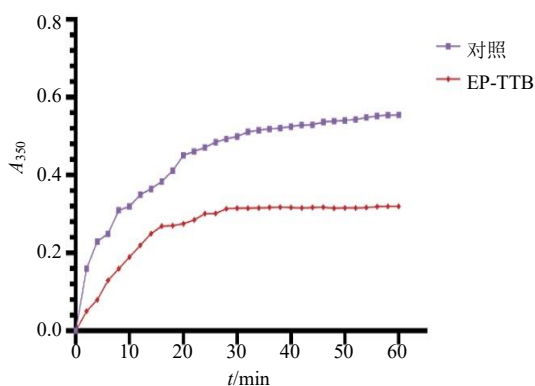
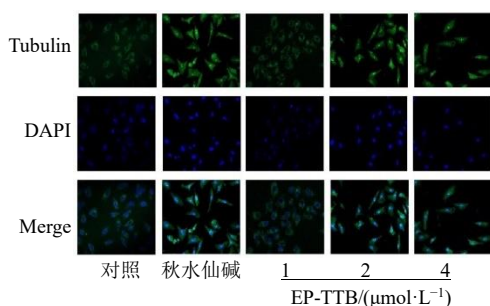


图 8 EP-TTB 的体外微管蛋白聚合抑制活性 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 8 *In vitro* tubulin polymerization inhibitory activity of EP-TTB ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 EP-TTB  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较: # $P < 0.05$ ; 与 EP-TTB  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较: & $P < 0.05$ 。  
\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  vs EP-TTB  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group; & $P < 0.05$  vs EP-TTB  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group.

图 9 用免疫荧光法观察 EP-TTB 在 A549 细胞中的染色结果 ( $\times 400$ )

Fig. 9 Staining results of EP-TTB in A549 cells observed by immunofluorescence ( $\times 400$ )

低 ( $P < 0.01$ ,  $0.001$ ), 且呈现浓度相关性抑制。

### 3.11 微管蛋白分子对接

如图 11 显示, EP-TTB 可与微管蛋白的 GLN-11、CYS-12、GLY-142、THR-143 等氨基酸残基形成氢键相互作用。其结合能为  $-7.9 \text{ kcal/mol}$  ( $1 \text{ cal} =$

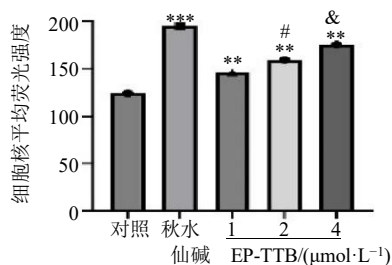
微管蛋白的体外聚合过程。

### 3.9 EP-TTB 抑制 A549 细胞的微管蛋白聚合

如图 9 所示, 与对照组相比, EP-TTB 组细胞形态发生显著变化, 由不规则多边形逐渐向圆形转变, 伴随细胞膜增厚。值得注意的是, 尽管细胞形态改变, 但细胞核复制进程并未受阻, EP-TTB  $4 \mu\text{mol/L}$  组出现典型的多核细胞现象。相比于对照组, EP-TTB 组细胞核荧光强度显著升高 ( $P < 0.01$ )。上述结果表明, EP-TTB 在细胞水平具有显著的微管蛋白聚合抑制活性。

### 3.10 EP-TTB 对 A549 细胞微管蛋白表达的影响

如图 10 所示, Western blotting 分析表明, EP-TTB 组 A549 细胞中  $\beta$ -tubulin 蛋白表达水平显著降

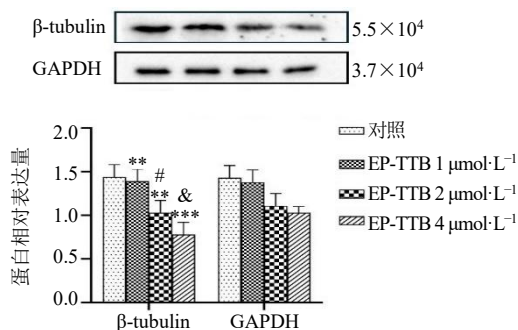


$4.2 \text{ J}$ ), 低于微管蛋白抑制剂 CA-4 的结合能 ( $-5.6 \text{ kcal/mol}$ ), 表明 EP-TTB 与靶蛋白的结合更稳定。

### 3.12 TrxR 分子对接

如图 12 所示, EP-TTB 能够与 TrxR 的 ARG-221 和 ARG-166 残基形成氢键相互作用, 结合能为





与对照组比较:  $**P < 0.01$   $***P < 0.001$ ; 与 EP-TTB 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较:  $\#P < 0.05$ ; 与 EP-TTB 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较:  $\&P < 0.05$ 。  
 $**P < 0.01$   $***P < 0.001$  vs control group;  $\#P < 0.05$  vs EP-TTB 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group;  $\&P < 0.05$  vs EP-TTB 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.

图 10 EP-TTB 对 A549 细胞微管相关蛋白表达的影响  
 $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

Fig. 10 Effects of EP-TTB on the expression of microtubule-associated proteins in A549 cells  $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

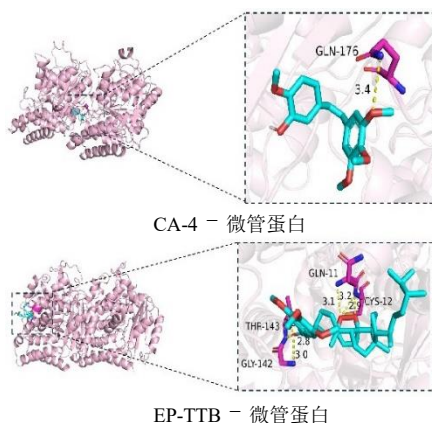


图 11 CA-4 和 EP-TTB 与微管蛋白的分子对接

Fig. 11 Molecular docking of CA-4 and EP-TTB with microtubule protein

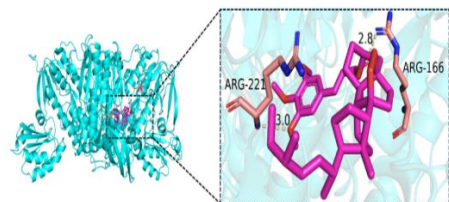


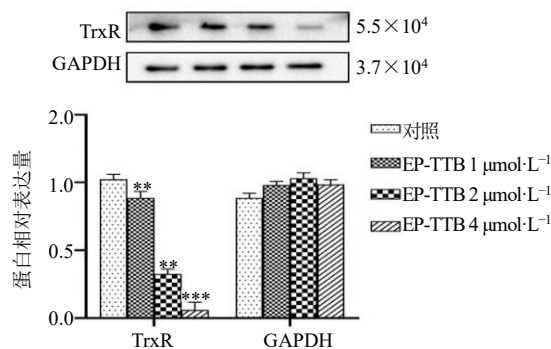
图 12 EP-TTB 与硫氧还蛋白还原酶蛋白的分子对接

Fig. 12 Molecular docking of EP-TTB with thioredoxin reductase protein

-8.3 kcal/mol, 表明该化合物与靶蛋白之间具有较强且稳定的结合能力。

**3.13 EP-TTB 对 A549 细胞 TrxR 蛋白表达的影响**  
 结果如图 13 所示, Western blotting 分析表明,

EP-TTB 组 A549 细胞中 TrxR 的蛋白表达水平显著下降 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。这一结果提示, EP-TTB 可能通过抑制细胞内 TrxR 的表达, 进而参与调控其促凋亡效应。



与对照组比较:  $**P < 0.01$   $***P < 0.001$ 。

$**P < 0.01$   $***P < 0.001$  vs control group.

图 13 EP-TTB 对 A549 细胞 TrxR 相关蛋白表达的影响  
 $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

Fig. 13 Effects of EP-TTB on TrxR-related protein expression in A549 cells  $(\bar{x} \pm s, n = 3)$

#### 4 讨论

肺癌是世界上最常见的癌症类型。由于早期诊断的局限性, 大多数肺癌患者在中期或晚期被诊断出来。此外, 化疗药物耐药性的增加, 使人们对天然产物治疗肺癌更加关注<sup>[30]</sup>。因此, 从天然来源中寻找有效的抗癌药物受到了广泛关注。过氧化麦角甾醇是一种天然类固醇化合物, 据报道具有显著的抗肿瘤活性。但其水溶性差、细胞摄取性差, 对肿瘤细胞的杀伤作用较弱。课题组前期研究发现, 过氧麦角甾醇对 A549 细胞具有明显的抑制作用<sup>[10]</sup>。为进一步提高其选择性与生物活性, 本研究在过氧化麦角甾醇的 C3 位引入三甲氧基苯结构, 设计合成新型衍生物 EP-TTB, 并探究其对肺癌细胞的作用机制。微管蛋白在维持细胞形态和有丝分裂过程中发挥关键作用<sup>[31]</sup>。在有丝分裂进程中, 纺锤体的正常组装依赖于微管的动态重排, 是染色体精确分离的保障。靶向微管蛋白可干扰有丝分裂进程, 从而抑制肿瘤细胞增殖。另一方面, 硫氧还蛋白 (Trx) 系统作为关键的氧化还原调控体系, 在肿瘤发生发展中具有双重作用: 早期可抵抗氧化应激, 后期则可能促进肿瘤进展<sup>[32]</sup>。本研究以人非小细胞肺癌 A549 细胞为对象, 综合评估了 EP-TTB 的体外抗肿瘤活性及其潜在机制。

MTT 结果显示, EP-TTB 可浓度相关性地抑制 A549 细胞增殖。流式细胞术检测表明, 该化合物能够诱导细胞凋亡, 并伴随 ROS 水平升高、线粒体膜电位下降以及细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。通过微管绿色荧光染色试剂盒观察到 EP-TTB 4 μmol/L 组出现典型的多核细胞现象, 证明 EP-TTB 在细胞水平具有显著的微管蛋白聚合抑制活性。进一步机制研究表明, EP-TTB 组可上调促凋亡蛋白 Cyt-C 和 Bax 的表达, 同时下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、磷酸化 PI3K/Akt、β-tubulin 以及 TrxR 的表达。Western blotting 结果进一步验证了 EP-TTB 在诱导凋亡、干扰细胞周期及破坏氧化还原平衡方面的作用。分子对接分析提示, EP-TTB 与微管蛋白及 TrxR 均具有较好的结合能力, 为其多靶点作用机制提供了结构依据。

综上所述, EP-TTB 在体外能有效抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能涉及对微管蛋白聚合与 TrxR 的双重靶向抑制。这些发现为该化合物的多靶点抗肿瘤活性提供了初步证据, 展现出良好的深入研究价值。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Jeon H, Wang S, Song J M, *et al.* Update 2025: Management of non-small-cell lung cancer [J]. *Lung*, 2025, 203(1): 53.
- [2] 郭明鑫, 周希涵, 吴霞, 等. 天然产物抗肺癌作用及其机制的研究进展 [J]. *西北药学杂志*, 2024, 39(2): 247-254.
- [3] Merdivan S, Lindequist U. Ergosterol peroxide: A Mushroom-derived compound with promising biological activities-a review [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2017, 19(2): 93-105.
- [4] Lin Y D, Wen B Q, Zhang Z W, *et al.* Ergosterol peroxide: An effect-directed detecting method from *Anoectochilus elwesii* and evaluation of anticancer activity [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(12): 3177-3182.
- [5] Bocachica-Adorno A L, Aponte-Ramos A Y, Rivera-Fuentes P S, *et al.* Ergosterol peroxide disrupts triple-negative breast cancer mitochondrial function and inhibits tumor growth and metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(10): 4588.
- [6] Ling T T, Arroyo-Cruz L V, Smither W R, *et al.* Early preclinical studies of ergosterol peroxide and biological evaluation of its derivatives [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(35): 37117-37127.
- [7] He L F, Shi W J, Liu X C, *et al.* Anticancer action and mechanism of ergosterol peroxide from *Paecilomyces cicadae* fermentation broth [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3935.
- [8] Liu Y, Wang X, Wang J, *et al.* Ergosterol peroxide inhibits porcine epidemic diarrhea virus infection in vero cells by suppressing ROS generation and p53 activation [J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 402.
- [9] Wu H Y, Yang F L, Li L H, *et al.* Ergosterol peroxide from marine fungus *Phoma sp.* induces ROS-dependent apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17956.
- [10] 任文康, 罗然, 王璐, 等. 基于网络药理学及体外实验探讨过氧麦角甾醇对非小细胞肺癌 A549 细胞的作用机制 [J]. *中南药学*, 2024, 22(11): 2871-2879.
- [11] Wang L, Tian S, Deng S Q, *et al.* Design and synthesis of novel mitochondria-targeted ergosterol peroxide derivatives as potential anti-cancer agents [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 153: 107862.
- [12] Deng S Q, Wang L, Tian S, *et al.* Thiazolidinedione-based structure modification of ergosterol peroxide provides thiazolidinedione-conjugated derivatives as potent agents against breast cancer cells through a PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Bioorg Med Chem*, 2025, 117: 118007.
- [13] Luo R, Zhao H Y, Deng S Q, *et al.* Discovery and optimization of ergosterol peroxide derivatives as novel glutaminase 1 inhibitors for the treatment of triple-negative breast cancer [J]. *Molecules*, 2024, 29(18): 4375.
- [14] 林仲翔, 王端顺, 范保荣, 等. 人肿瘤细胞与正常细胞内微管的 PAP 免疫酶细胞化学观察 [J]. *解剖学报*, 1986(1): 79-84.
- [15] 金珊, 柳惠图, 王端顺. 钙调素对微管组装的调节作用 [J]. *解剖学报*, 1994(3): 298-303.
- [16] Ji Y T, Liu Y N, Liu Z P. Tubulin colchicine binding site inhibitors as vascular disrupting agents in clinical development [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(11): 1348-1360.
- [17] Thorpe P E. Vascular targeting agents as cancer therapeutics [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(2): 415-427.
- [18] Kamal M A, Al-Zahrani M H, Khan S H, *et al.* Tubulin proteins in cancer resistance: A review [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(3): 178-185.
- [19] Baytas S N. Recent advances in combretastatin A-4 inspired inhibitors of tubulin polymerization: An update [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29(20): 3557-3585.
- [20] Paidakula S, Nerella S, Kankala S, *et al.* Recent trends in tubulin-binding combretastatin A-4 analogs for anticancer drug development [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29(21): 3748-3773.

- [21] Leung Y Y, Yao Hui L L, Kraus V B. Colchicine--Update on mechanisms of action and therapeutic uses [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2015, 45(3): 341-350.
- [22] Kumar V, Dhawan S, Girase P S, *et al.* Recent advances in chalcone-based anticancer heterocycles: A structural and molecular target perspective [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(33): 6805-6845.
- [23] Cairns R A, Harris I S, Mak T W. Regulation of cancer cell metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2): 85.
- [24] Shaw A T, Winslow M M, Magendantz M, *et al.* Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(21): 8773-8778.
- [25] Raj L, Ide T, Gurkar A U, *et al.* Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS [J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 231-234.
- [26] Glasauer A, Sena L A, Diebold L P, *et al.* Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(1): 117-128.
- [27] Zhang J M, Li X M, Han X, *et al.* Targeting the thioredoxin system for cancer therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(9): 794-808.
- [28] Chupakhin E, Krasavin M. Thioredoxin reductase inhibitors: Updated patent review (2017-present) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2021, 31(8): 745-758.
- [29] Joardar N, Guevara-Flores A, Martínez-González J J, *et al.* Thiol antioxidant thioredoxin reductase: A prospective biochemical crossroads between anticancer and antiparasitic treatments of the modern era [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 165(Pt A): 249-267.
- [30] Robles-Fernández I, Rodríguez-Serrano F, Álvarez P J, *et al.* Antitumor properties of natural compounds and related molecules [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2013, 8(3): 203-215.
- [31] Zich J, Hardwick K G. Getting down to the phosphorylated nuts and bolts of spindle checkpoint signalling [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(1): 18-27.
- [32] Powis G, Oblong J E, Gasdaska P Y, *et al.* The thioredoxin/thioredoxin reductase redox system and control of cell-growth [J]. *Oncol Res*, 1994, 6(10-11): 539-544.

[责任编辑 高源]