

基于蛋白组学、分子对接和实验验证探究羽扇豆醇抗人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的作用机制

祝梦鑫, 李登辉, 林 强, 赵音旭, 都晓辉*, 卜 明*

齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: **目的** 基于蛋白组学、分子对接和实验验证探究羽扇豆醇抗乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的作用机制。**方法** 采用 MTT 法检测羽扇豆醇 (5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响; 流式细胞术检测细胞凋亡率和活性氧水平的变化情况; 蛋白组学预测靶点通路, 通过 AutoDockTools 软件对羽扇豆醇与核糖核苷酸还原酶调节亚基 M2 (RRM2) 蛋白进行分子对接; 酶标仪检测细胞内 Ca^{2+} 、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH) 浓度以及铁含量; Western blotting 法检测钙失衡、凋亡、铁死亡相关蛋白表达水平; 羽扇豆醇联用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1), 检测细胞中的 MDA、SOD、GSH 和铁水平以及铁死亡相关蛋白表达水平。**结果** 羽扇豆醇作用 MCF-7 细胞 24、48、72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 (93.43 ± 1.87)、(63.02 ± 1.56)、(41.58 ± 1.23) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且与对照组比较, 可显著诱导细胞凋亡、升高活性氧水平 ($P < 0.01$ 、 0.001); 蛋白组学富集分析结果在铁死亡高度富集, 羽扇豆醇与 RRM2 蛋白的结合自由能为 $-33.64 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。与对照组比较, 羽扇豆醇组 MCF-7 细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 2 型兰尼碱受体 (RyR2) 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001), 三磷酸肌醇受体 1 (IP3R1) 蛋白表达呈上调趋势, 从而引发钙稳态失衡; 高钙环境进一步激活凋亡通路, Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、细胞色素 C (Cyt C) 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001), B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 蛋白表达显著下降 ($P < 0.001$); MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 同时铁水平显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), RRM2、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白表达显著下降 ($P < 0.001$); 与羽扇豆醇组比较, Fer-1+羽扇豆醇组的 MDA 和铁含量显著降低 ($P < 0.001$), SOD 和 GSH 水平显著升高 ($P < 0.001$), RRM2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$), 几乎恢复至对照组水平。**结论** 羽扇豆醇可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 同时能够诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生铁死亡, 其作用机制可能与 RRM2 低表达及 SLC7A11/GPX4 通路被抑制密切相关。

关键词: 羽扇豆醇; 乳腺癌; TMT 蛋白组学; 铁死亡; RRM2; SLC7A11/GPX4 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)12-3470-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.006

Mechanism of lupeol in inhibiting proliferation of human breast cancer cells MCF-7 based on proteomics, molecular docking and experimental validation

ZHU Mengxin, LI Denghui, LIN Qiang, ZHAO Yinxu, DU Xiaohui, BU Ming

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

Abstract: Objective To explore the mechanism of lupeol against the proliferation of breast cancer MCF-7 cells based on proteomics, molecular docking, and experimental verification. **Methods** The effects of lupeol (5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the viability of breast cancer MCF-7 cells were detected by MTT assay; The apoptosis rate and reactive oxygen species (ROS) levels were detected by flow cytometry; The target pathways were predicted by proteomics, and the molecular docking of lupeol with the regulatory subunit M2 (RRM2) of ribonucleotide reductase was performed by AutoDockTools software; The intracellular Ca^{2+} , malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) concentrations and iron content were detected by microplate reader; the expression

收稿日期: 2025-07-24

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动金资助项目 (LBH-QY24003); 齐齐哈尔医学院重点学科建设资助项目 (QYZDXK-008)

作者简介: 祝梦鑫 (1998—), 男, 硕士研究生, 主要从事药物抗肿瘤基础研究。E-mail: 18530752817@163.com

*通信作者: 都晓辉 (1987—), 女, 博士, 讲师, 主要从事药物抗肿瘤基础研究。E-mail: duxiaohui@qmu.edu.cn

卜 明 (1986—), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然药物抗肿瘤作用研究。E-mail: buming@qmu.edu.cn

levels of proteins related to calcium imbalance, apoptosis and ferroptosis were detected by Western blotting; lupeol was combined with the ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1), and the levels of MDA, SOD, GSH and iron in cells and the expression levels of proteins related to ferroptosis were detected. **Results** The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of lupeol on MCF-7 cells for 24, 48 and 72 h were (93.43 ± 1.87) , (63.02 ± 1.56) and $(41.58 \pm 1.23) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Compared with the control group, lupeol could significantly induce apoptosis and increase ROS levels ($P < 0.01$, 0.001). The enrichment analysis of proteomics was highly enriched in ferroptosis, and the binding free energy of lupeol with RRM2 protein was $-33.64 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Compared with the control group, the intracellular Ca^{2+} concentration in the lupeol group was significantly increased ($P < 0.01$, 0.001), and the expression of type 2 ryanodine receptor (RyR2) protein was significantly upregulated ($P < 0.01$, 0.001), while the expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1 (IP3R1) protein showed an upward trend, thereby causing calcium homeostasis imbalance. The high calcium environment further activated the apoptosis pathway, and the expression of Bcl-2 associated X protein (Bax) and cytochrome C (Cyt C) proteins was significantly upregulated ($P < 0.01$, 0.001), while the expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein was significantly downregulated ($P < 0.001$). The MDA content was significantly increased ($P < 0.01$, 0.001), the SOD activity was significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001), and the iron level was significantly increased ($P < 0.01$, 0.001), while the GSH level was significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001). The expression of acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) protein was significantly increased ($P < 0.001$), while the expression of RRM2, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) proteins was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with the lupeol group, the MDA and iron content in the Fer-1 + lupeol group were significantly decreased ($P < 0.001$), the SOD and GSH levels were significantly increased ($P < 0.001$), the expression of RRM2, SLC7A11, and GPX4 proteins was significantly increased ($P < 0.001$), and the expression of ACSL4 protein was significantly decreased ($P < 0.001$), almost returning to the level of the control group. **Conclusion** Lupeol can inhibit the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and induce cell apoptosis; meanwhile, it can also induce ferroptosis in breast cancer MCF-7 cells, and its mechanism may be closely related to the downregulated expression of RRM2 and the inhibition of the SLC7A11/GPX4 pathway.

Key words: lupeol; breast cancer; TMT proteomics; ferroptosis; RRM2; SLC7A11/GPX4 signaling axis

乳腺癌是女性中最常见的癌症,全世界每年有 170 万人被诊断出乳腺癌,约有 50 万人死于这种疾病^[1]。虽然已应用手术切除、放疗、化疗、内分泌治疗和靶向治疗,但乳腺癌患者的预后仍不理想^[2]。因此,探索天然产物中的新型抗乳腺癌药物具有重要的研究价值。

羽扇豆醇是一种天然五环三萜类化合物^[3],具有抗炎、抗氧化、抗基因突变、抗肿瘤等药理活性,在抗乳腺癌方面的潜在作用机制逐渐成为研究焦点。上皮-间充质转化(EMT)在多数肿瘤细胞侵袭转移过程中起主要作用,张昕^[4]研究表明,羽扇豆醇可通过下调蛋白激酶 B (Akt)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路诱导自噬来抑制细胞 EMT 进程,进而抑制 EMT 关键转录因子 Twist1 的表达,从而实现对三阴性乳腺癌抗增殖及抗转移作用。曹文富等^[5]研究发现羽扇豆醇能够通过抑制 Wnt/ β -连锁蛋白(β -catenin)信号通路的相关基因的表达,从而抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖与侵袭。王明等^[6]研究发现羽扇豆醇可通过下调基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 的表达以及影响磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/Akt/核因子 κ B(NF- κ B)信号

通路进而抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭转移。但目前羽扇豆醇在抗乳腺癌作用机制的研究中尚不全面,通过串联质谱标签标记(TMT)蛋白质组学系统地探索药物作用机制与疾病发生发展的内在联系,是一种全面、深入解析羽扇豆醇对乳腺癌 MCF-7 细胞作用机制的有效手段。

铁死亡是铁依赖性的脂质过氧化物过量堆积致使细胞膜损伤从而引起的细胞死亡模式^[7]。细胞内游离铁离子的增多、脂质过氧化和谷胱甘肽(GSH)的消耗是铁死亡不可或缺的标志^[8]。越来越多的研究表明,铁死亡在杀死肿瘤细胞和抑制肿瘤生长方面起着至关重要的作用。铁死亡已被确定为非小细胞肺癌^[9]、乳腺癌^[10]、胰腺癌^[11]、肝癌^[12]等导致肿瘤细胞死亡的原因。因此,铁死亡诱导剂有望为抗癌治疗提供潜在的策略,这引起了广泛关注。

传统药物研发模式主要遵循单一靶点导向的研究路径,近年来,蛋白质组学技术飞速发展,TMT 定量蛋白质组学技术以其高通量、高分离能力、高灵敏度和高稳定性的特点成为蛋白质组学技术中最可靠的质谱定量方法^[13]。本研究基于 TMT 蛋白质组学以及体外实验分析,深入探究羽扇豆醇抗乳腺

癌的作用机制,为进一步挖掘羽扇豆醇的药用价值、开发新型治疗策略提供理论支持。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞系 MCF-7 (批号 CL-0149) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品及主要试剂

羽扇豆醇 (批号 L114075, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自阿拉丁试剂有限公司; DMEM 培养基 (批号 CM10013) 购自中科迈晨 (北京) 科技有限责任公司; 胎牛血清 (批号 086-150) 购自维森特生物技术 (南京) 有限公司; MTT 试剂盒 (批号 E606334) 购自广州赛维尔生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 KGA107) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (批号 CA1410) 购自北京索莱宝科技有限公司; 丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号 A003-2-2)、组织铁试剂盒 (批号 A039-2-1)、总超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号 A001-3-1) 购自南京建成生物工程研究所; GSH 检测试剂盒 (批号 S0053) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; BCA 试剂盒 (批号 E112-01) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; RIPA 裂解液 (批号 20115E) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 抗体 (批号 3498S)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (批号 5023S)、细胞色素 C (Cyt C) 抗体 (批号 4280S)、2 型兰尼碱受体 (RyR2) 抗体 (批号 19765-1-AP)、磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 5174S)、 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号 66009-1-Ig)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 抗体 (批号 22401-1-AP)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 抗体 (批号 67763-1-Ig)、核糖核苷酸还原酶调节亚基 M2 (RRM2) 抗体 (批号 11661-1-AP)、山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 RGAR001) 购自武汉三鹰生物有限公司; 溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) (批号 GB115276-100) 抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 三磷酸肌醇受体 1 (IP3R1) 抗体 (E-8) (批号 sc-271197) 购自圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司; Ferostatin-1 (Fer-1, 批号 HY-100579) 购自上海 MCE 公司; ECL 显色试剂盒 (批号 36208ES) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 蛋白酶抑制剂 III (批号 539134)、蛋白酶抑制剂 V (批号 539137)、蛋白酶抑制剂 VI

(批号 539133)、蛋白酶抑制剂 IV (批号 539136) 购自上海默克密理博有限公司。

1.3 实验仪器

Heracell™ VIOS 160i CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); Epoch 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); FACS Calibur 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); Waters Quattro-premier 质谱仪 (美国 WATERS 公司); NanoElute 超高效液相系统 (美国 BRUKER 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及 MTT 法检测细胞活力

人 MCF-7 乳腺癌细胞在含 10% FBS 及 1% 双抗 (青霉素-链霉素) 的 DMEM 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。将处于对数生长期的 MCF-7 乳腺癌细胞以每孔 3×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 待细胞完全贴壁后弃去培养基。实验设对照组及 5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 羽扇豆醇干预组, 每孔加入 100 μL 相应含药培养基, 对照组加入等体积 DMEM 培养基。分别干预 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 孵育 4 h, 弃去培养液, 加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 振荡混匀后于 570 nm 波长下测定吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率, 采用 SPSS 25.0 软件计算羽扇豆醇对 MCF-7 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 细胞凋亡检测

将 MCF-7 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板, 待细胞完全贴壁后进行实验分组, 包括对照组及羽扇豆醇 (30、60、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 对照组不给药, 干预 48 h 后, 收集细胞, 磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒染色, 室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测, 数据通过 Flow Jo 10.8.1 软件分析。

2.3 ROS 测定

按“2.2”项方法进行细胞培养及分组。培养 48 h 后, 加入 500 μL DCFH-DA 染液, 37 °C 避光孵育 20 min, 无血清培养基洗涤 3 次, 用流式细胞仪检测, 数据通过 Flow Jo 10.8.1 软件分析。

2.4 TMT 蛋白组学及生物信息学探究羽扇豆醇作用机制

2.4.1 细胞处理 取对数生长期的 MCF-7 细胞接

种于培养皿中,继续培养 24 h 至细胞贴壁后,药物分为对照组和羽扇豆醇组($60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每组设置 3 个复孔,进行药物干预 48 h,对照组不给药,用不含 EDTA 的胰酶消化,收集至 1.5 mL 离心管中, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min,收集细胞沉淀。

2.4.2 蛋白提取 缓慢向样品中加入终浓度为 20% 的三氯乙酸(TCA)以沉淀蛋白质,涡旋混匀,并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }500\times g$ 的条件下离心 5 min,收集沉淀。用预冷的丙酮将沉淀的蛋白质洗涤 3 次,干燥 1 min。将蛋白质样品重新溶解于 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三(羟甲基)氨基甲烷-乙酸缓冲液(TEAB)中,并进行超声分散。按照胰蛋白酶与蛋白质质量比为 1:50 的比例加入胰蛋白酶,进行过夜消化。将样品在 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇还原 30 min,在室温、避光条件下用 $11\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺烷基化 15 min。最后,使用 Strata X 固相萃取柱对肽段进行脱盐处理。上述操作由杭州市景杰科技股份有限公司进行检测。

2.4.3 液相色谱-质谱联用分析 胰酶消化的肽段溶解于流动相 A 后,直接上样至自制的反相分析柱(25 cm 长度, $100\text{ }\mu\text{m}$ 内径)。流动相为 A (0.1% 甲酸, 2% 乙腈/水)和 B (0.1% 甲酸乙腈),梯度洗脱程序如下: $0\sim 14\text{ min}$, $6\%\rightarrow 24\%$ B; $14\sim 16\text{ min}$, $24\%\rightarrow 35\%$ B; $16\sim 18\text{ min}$, $35\%\rightarrow 80\%$ B; $18\sim 20\text{ min}$, 80% B,体积流量恒定 $500\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。肽段经毛细管源导入 timsTOF Pro 质谱仪,电喷雾电压 1.75 kV 。前体离子和碎片离子在 TOF 检测器中分析,质谱以数据非依赖型并行累积串行碎裂(dia-PASEF)模式运行。全扫描范围为 $300\sim 1\text{ }500$ (MS/MS 扫描范围),每个循环采集 20 次 PASEF-MS/MS 扫描。MS/MS 扫描范围设为 $400\sim 850$,隔离窗口为 7 m/z 。

2.4.4 数据库检索 使用 DIA-NN 搜索引擎(v.1.8)处理数据非依赖采集(DIA)数据。将串联质谱图与 Homo_sapiens_9606_SP_20231220.fasta 数据库以及反向诱饵数据库进行比对搜索。指定胰蛋白酶/P 为裂解酶,允许最多 1 次未裂解。将 N 端甲硫氨酸(Met)的切除和半胱氨酸(Cys)的氨甲酰甲基化指定为固定修饰。将伪发现率(FDR)调整至 $<1\%$ 。使用 T-test 进行统计学分析,当 $P<0.05$ 时,以差异表达量变化超过 1.5 作为显著上调的变化阈值,小于 1/1.5 作为显著下调的变化阈值,鉴定差异表达蛋白(DEPs)。

2.4.5 基因本体论(GO) 使用 Egnog-mapper 软件,基于 EggNOG 数据库从 DEPs 中提取 GO 标识符,然后根据细胞组分(CC)、分子功能(MF)和生物过程(BP)对蛋白质进行功能分类注释分析。

2.4.6 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路 基于 KEGG 通路数据库对蛋白质通路进行注释,并通过 BLAST 比对(blastp, $e\text{ value}\leq 1\times 10^{-4}$)鉴定蛋白质,对于每条序列,注释基于得分最高的比对结果。

2.4.7 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络 所有 DEPs 数据库登录号或序列在 STRING 数据库中进行搜索,以查找 PPI。仅选择属于搜索数据集的蛋白质之间的相互作用,从而排除外部候选对象。STRING 定义了一个称为“置信度得分”的指标来定义相互作用的置信度;提取了所有置信度得分 >0.7 (高置信度)的相互作用,并进行可视化处理。

2.5 分子对接

从 PubChem 数据库获取羽扇豆醇的 3D 分子结构,并通过 AutoDockTools 软件对其进行预处理。同时,从 PDB 数据库中提取相关靶蛋白结构,运用 PyMOL 软件去除原蛋白结构中的配体分子和非蛋白组分,随后使用 AutoDockTools 软件进行加氢、电荷分配及总电荷计算等操作。对接完成后,采用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化呈现。

2.6 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定

将 MCF-7 细胞以每孔 1×10^5 个的密度接种于 6 孔板,待细胞完全贴壁后进行实验分组,包括对照组及羽扇豆醇(30 、 60 、 $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。对照组不给药,干预 48 h 后弃去培养基,PBS 洗涤,加入 Fluo-4/AM 染色液,室温避光孵育 20 min。使用酶标仪检测荧光强度,激发波长为 488 nm ,发射波长为 530 nm ,计算细胞内 Ca^{2+} 浓度。

2.7 MDA、SOD 和组织铁的测定

按照“2.2”项方法进行细胞培养、分组及给药,收集 MCF-7 细胞后用 1 mL PBS 轻轻吹打, $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 弃上清,在细胞沉淀中加入一定量的 PBS,对细胞样本进行超声(功率 300 W ,冰水浴,5 s 一次,间隔 4 次,间隔时间 30 s)。分别参照 MDA、SOD、GSH、组织铁测定试剂盒说明书进行检测。

2.8 Western blotting 检测蛋白表达水平

按照“2.2”项方法进行细胞培养、分组及给药,采用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定

量和变性处理。蛋白经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳后转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000) 于 4 °C 过夜孵育。洗涤后, 加入相对应来源的二抗 (1:2 000) 孵育 1.5 h, 洗涤后使用凝胶成像仪成像, Image J 软件分析。

2.9 Fer-1 对羽扇豆醇诱导铁死亡作用的影响

细胞接种方式同“2.2”项, 细胞先在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养 24 h, 之后弃去培养液, 随机分为对照组、羽扇豆醇 (60 μmol·L⁻¹) 组、羽扇豆醇 (60 μmol·L⁻¹) + Fer-1 (5 μmol·L⁻¹) 组、Fer-1 (5 μmol·L⁻¹) 组, 对照组不给药, 干预 48 h。各组细胞所有处理均完成后, 去除细胞培养液, 收集细胞, 按照“2.7”“2.8”项方法进行测定。

2.10 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, 以检验水准 $\alpha=0.05$ 作为统计学意义判断标准。

3 结果

3.1 羽扇豆醇对人乳腺癌细胞增殖的影响

结果显示 (图 1), 与对照组相比, 20、40、80、160 μmol·L⁻¹ 羽扇豆醇作用于 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后, 细胞增殖抑制率显著升高 ($P<0.01$ 、0.001), 并呈现浓度-时间相关性。羽扇豆醇对 MCF-7 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 值分别为 (93.43±1.87)、(63.02±1.56)、(41.58±1.23) μmol·L⁻¹。后续实验中选择 30、60、120 μmol·L⁻¹ 作为给药浓度。

3.2 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞凋亡的影响

与对照组比较, 羽扇豆醇浓度在 60、120 μmol·L⁻¹ 时能够有效诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡 ($P<0.01$ 、0.001)。结果见图 2。

3.3 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞内 ROS 含量的影响

流式细胞术结果如图 3 显示, 与对照组相比, MCF-7 细胞内 ROS 水平随羽扇豆醇的浓度升高显著增加 ($P<0.01$ 、0.001), 作用呈现浓度相关性。

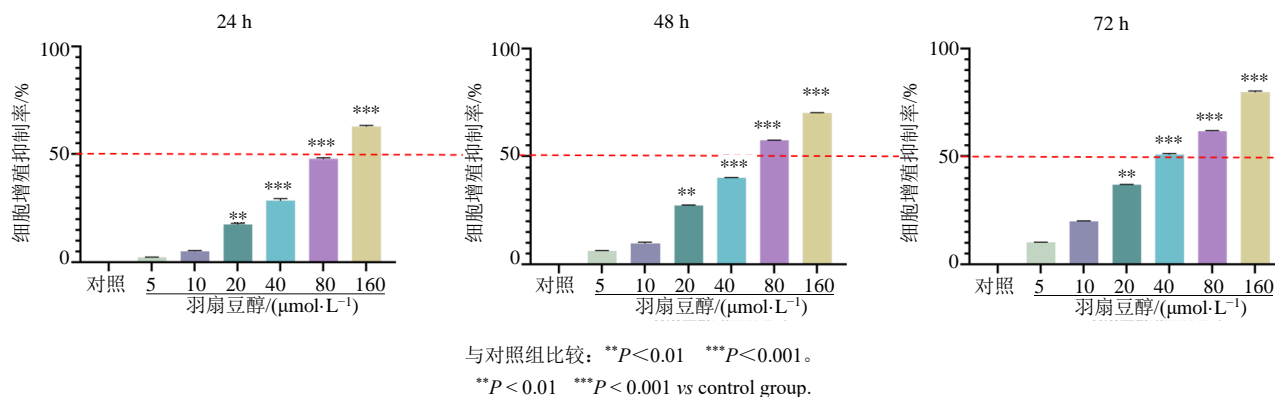


图 1 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inhibition rate of lupeol on proliferation of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

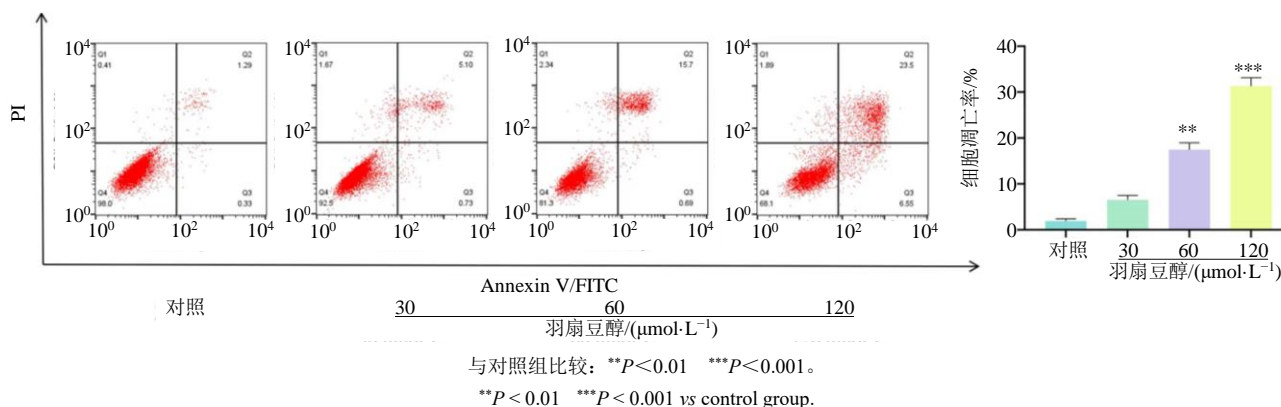


图 2 流式细胞术观察羽扇豆醇对 MCF-7 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of lupeol on apoptosis of MCF-7 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

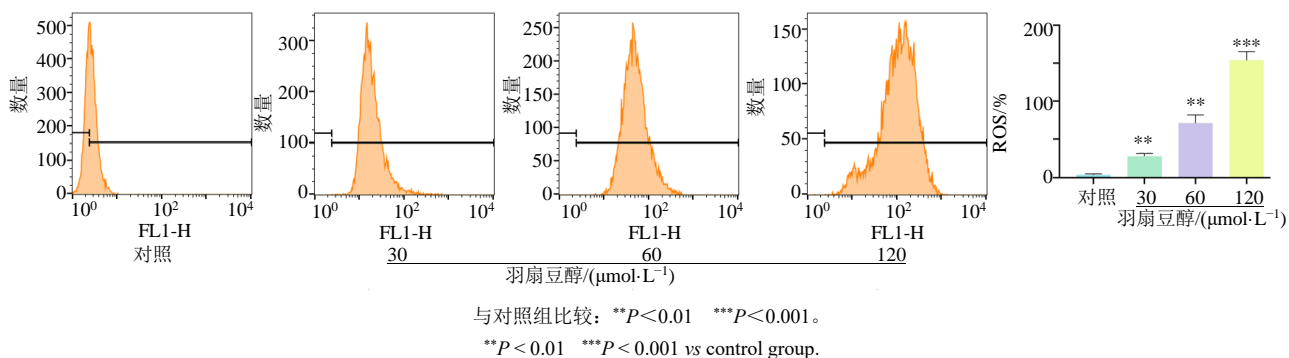


图 3 流式细胞术观察羽扇豆醇对 MCF-7 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Observation of effect of lupeol on ROS level in MCF-7 cells by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 羽扇豆醇作用 MCF-7 细胞后 TMT 蛋白组学及生物信息学分析

3.4.1 DEPs 分析 羽扇豆醇组与对照组相比共鉴定到 720 个 DEPs, 其中上调蛋白 337 种, 下调蛋白 383 种, 结果见图 4-A。将所有比较组中差异蛋白的并集画表达热图, 用于展示多个差异蛋白在不同样本中的相对表达水平, 呈现差异蛋白的相对表达量的聚类关系, 结果见图 4-B。针对包含 *T-test* *P* 值的比较组绘制火山图, 结果如图 4-C 所示, 其中, STEAP 家族蛋白作为铁还原酶, 参与铁离子的还原与转运, 其表达变化 (图中呈下调趋势) 可能直接影响细胞内铁稳态, 是调控铁死亡的“铁驱动力”; TOMM34 是线粒体膜蛋白, 参与线粒体蛋白转运, 而线粒体是铁代谢、脂质过氧化及 ROS 生成的核心场所, 其上调可能通过干预线粒体功能, 影响铁死亡相关的氧化应激水平; UHRF1 参与 DNA 甲基化调控, 可通过表观修饰 GPX4 (抗

氧化关键分子)、SLC7A11 (调控 GSH 合成、影响抗氧化系统) 等铁死亡核心基因的表达, 间接干预铁死亡进程。

3.4.2 GO 富集分析 从 GO 功能分类图中, 能够清晰看到 3 个本体所涵盖的二级条目以及对应的蛋白数量, 如图 5 所示, BP 主要富集到调控蛋白 470 种、初级代谢过程蛋白 416 种、细胞代谢过程蛋白 415 种等; CC 主要富集到细胞内解剖结构蛋白 672 种、细胞器蛋白 627 种、细胞质蛋白 624 种等; MF 主要富集到蛋白质结合蛋白 392 种、有机环状化合物结合蛋白 220 种、水解酶活性蛋白 159 种等。

如图 6 所示, 在 BP 分析中, 结果注释主要富集在蛋白质同源寡聚化 (protein homooligomerization)、DNA 模板化的 DNA 复制 (DNA-templated DNA replication)、蛋白质内化 (protein internalization)、二萜类代谢过程 (diterpenoid metabolic process)、视黄醇代谢过程

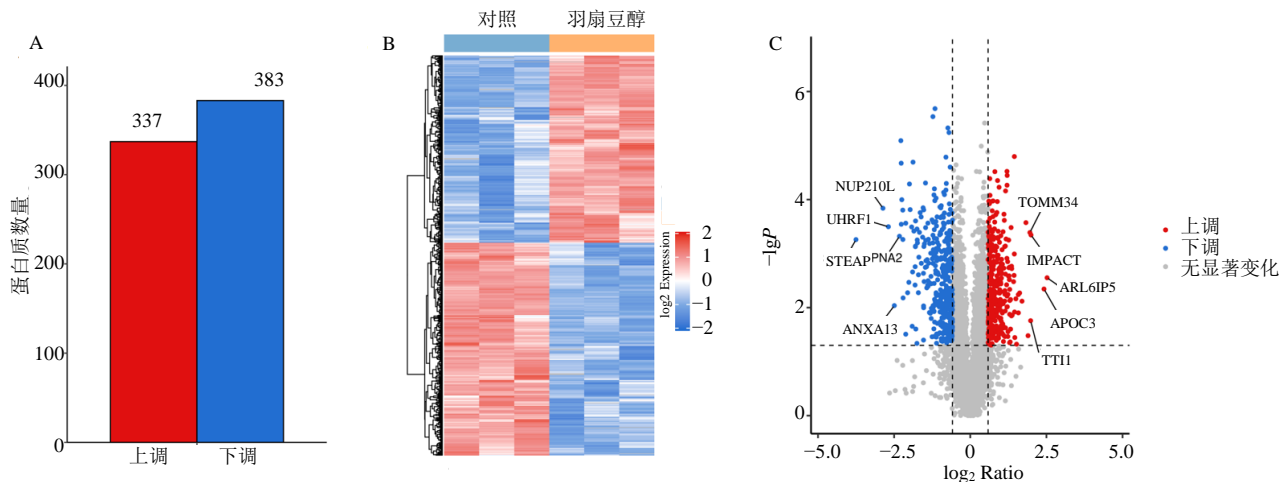


图 4 羽扇豆醇差异蛋白表达量聚类柱状图 (A)、热图 (B)、火山图 (C)

Fig. 4 Clustered bar chart (A), heatmap (B) and volcano plot (C) showing differential protein expression levels of lupeol

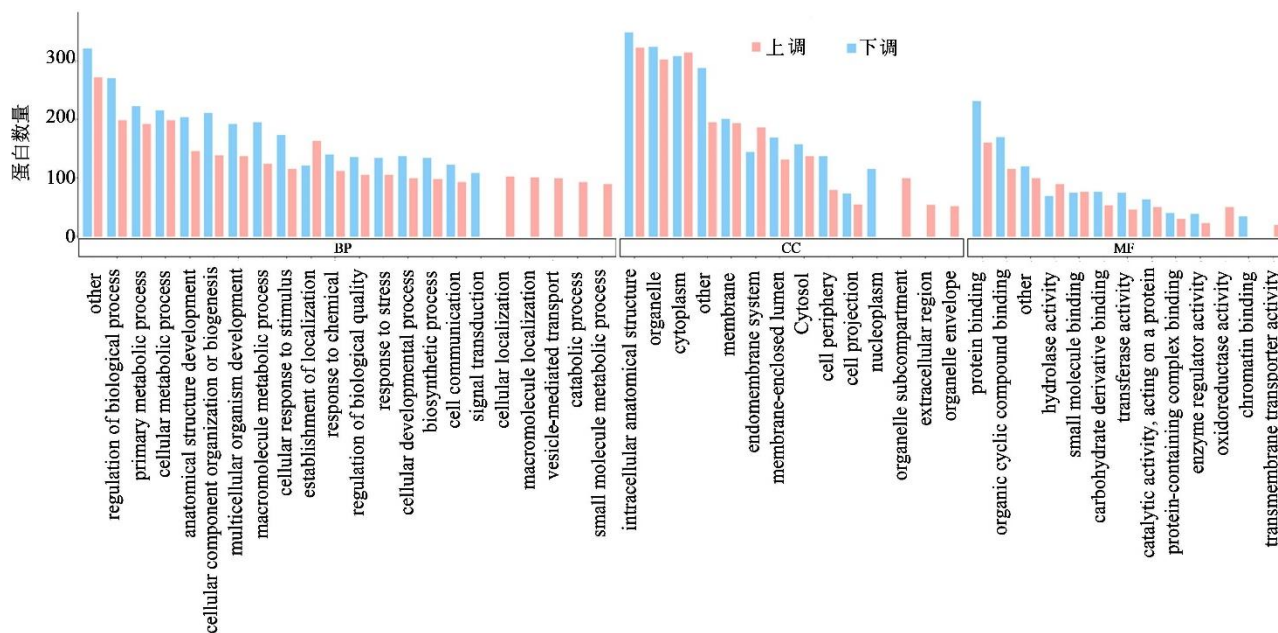


图 5 蛋白 GO 功能分类

Fig. 5 GO functional classification of protein

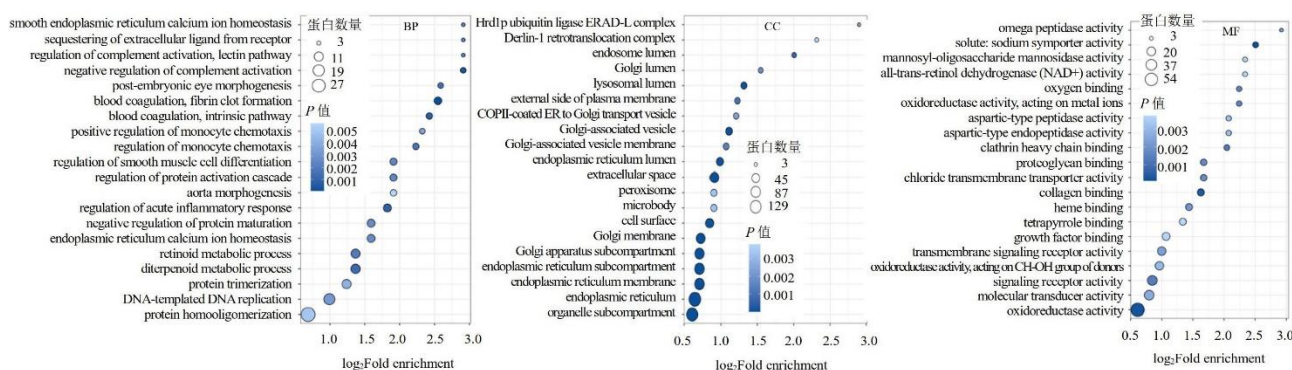


图 6 BP、CC、MF 差异蛋白的 GO 富集分析气泡图

Fig. 6 Bubble plot of GO enrichment analysis of differentially expressed proteins of BP, CC and MF

(retinol metabolic process)、内质网 Ca^{2+} 稳态 (endoplasmic reticulum calcium ion homeostasis) 等。在 CC 中, 结果注释主要富集在细胞器亚区室 (organelle subcompartment)、内质网 (endoplasmic reticulum)、内质网膜 (endoplasmic reticulum membrane)、内质网亚区室 (endoplasmic reticulum subcompartment)、高尔基体亚区室 (Golgi apparatus subcompartment)、高尔基体膜 (Golgi membrane)、细胞表面 (cell surface)、微体 (microbody) 等。在 MF 中, 结果注释主要富集在氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity)、分子传导蛋白活性 (molecular transducer activity)、信号受体活性 (signaling receptor activity)、氧化还原酶活性, 作用

于供体的 CH-OH 基团 (oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors)、跨膜信号受体活性 (transmembrane signaling receptor activity) 等。

在 BP 中, 内质网 Ca^{2+} 稳态相关差异蛋白显著富集。内质网作为细胞钙储存与调控核心细胞器, 其钙稳态失衡是铁死亡关键驱动因素, 可通过影响胞内钙浓度, 激活钙依赖氧化酶, 促进脂质过氧化底物生成, 推动铁死亡进程。MF 层面, 氧化还原酶活性相关差异蛋白富集, 这类酶参与 ROS 代谢、抗氧化系统调控 (如 GSH、GPX4 功能), 其功能异常会削弱细胞抗氧化防御, 加剧铁依赖的脂质过氧化, 协同钙信号紊乱, 共同构建铁死亡发生的“氧化-钙失衡”环境。

3.4.3 差异蛋白的 KEGG 通路分析 通过 Metascape 工具进行 KEGG 富集分析, 结果如图 7 所示, 其中差异蛋白主要富集在溶酶体通路 (hsa04142 Lysosome)、嘧啶代谢通路 (hsa00240 Pyrimidine metabolism)、蛋白质输出通路 (hsa03060 Protein export)、铁死亡通路 (hsa04216 Ferroptosis)、DNA 复制通路 (hsa03030 DNA replication) 等信号通路。而铁死亡通路 (hsa04216 Ferroptosis) 的富集尤为关键。结合铁死亡的生物学特性, 提示羽扇豆

醇可能通过多关键环节诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生铁依赖性程序性死亡: 一方面, 调控脂质过氧化, 促使细胞内脂质过氧化物累积, 破坏细胞膜等结构完整性; 另一方面, 干预 GSH 代谢, GSH 作为重要抗氧化物质, 其代谢异常会削弱细胞抗氧化能力, 加剧氧化损伤; 同时, 影响铁离子稳态, 使细胞内游离铁离子浓度失衡, 通过 Fenton 反应等产生大量 ROS, 进一步推动铁死亡进程, 从而为深入解析羽扇豆醇抗肿瘤机理开拓新方向。

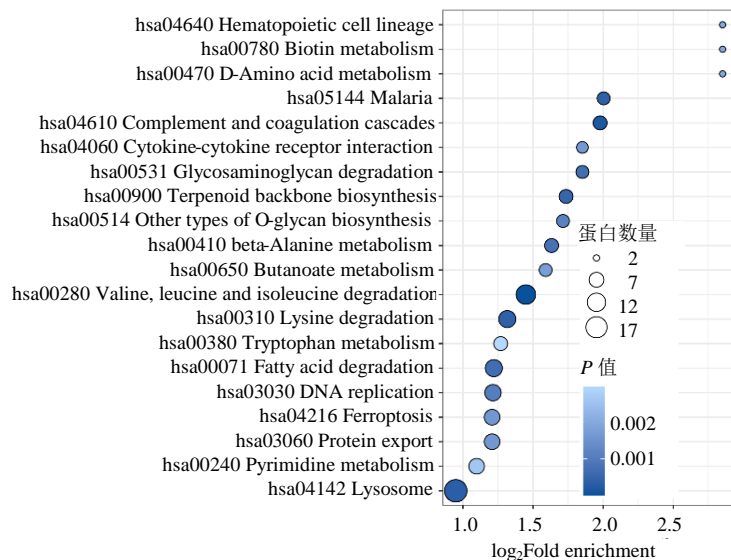


图 7 KEGG 通路气泡图

Fig. 7 KEGG pathway bubble plot

3.4.4 差异蛋白 PPI 互作网络分析 为深入探究差异蛋白间的相互作用机制, 本研究借助 STRING 数据库, 针对 720 种差异蛋白展开分析, 并构建出 PPI 互作网络, 并利用 Cytoscape 3.9.1 软件, 结合 “Network Analyzer” 工具及 Centiscape 2.2 插件对网络进行拓扑分析, 筛选核心靶点并绘制 PPI 网络图, 见图 8。根据度值排序, 排名前 10 的核心靶点依次为 CDK1、TOP2A、FN1、CCNB1、RRM2、MCM6、NCAPD2、RRM1、PLK1、ATAD2, 见表 1。其中, RRM2 作为与铁死亡直接关联的核心节点, 其在网络中与多个铁死亡相关蛋白存在潜在互作: RRM2 依赖铁硫簇结构参与细胞氧化还原平衡调控, 而铁死亡的核心特征 (铁过载、脂质过氧化) 可破坏其铁硫簇稳定性, 导致其功能异常, 进而通过加剧氧化应激、消耗 GSH 等方式, 推动铁死亡进程。

3.5 分子对接

根据 PPI 网络所得的结果, 从 PubChem 数据

库获取羽扇豆醇的 3D 分子结构, 并通过 AutoDockTools 软件对其进行预处理。同时, 从 PDB 数据库中提取靶蛋白结构: RRM2 (PDB ID: 2UW2), 将蛋白预处理, 使用 AutoDockTools 对接完成后, 采用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化呈现 (图 9)。

分子对接结果表明, 羽扇豆醇与 RRM2 蛋白 (PDB ID: 2UW2) 的结合自由能为 $-33.64 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 提示二者结合稳定性较强。从蛋白 surface 图可见, 羽扇豆醇能良好嵌入 RRM2 蛋白 (蓝绿色) 的结合口袋, 展现出优异的空间适配性; 蛋白 cartoon 图进一步呈现了 RRM2 蛋白的二级结构框架, 清晰定位出羽扇豆醇在蛋白上的结合区域。对接细节图中, 羽扇豆醇与关键氨基酸残基 GLU-232 形成了距离为 1.8 \AA ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$) 的氢键作用 (黄色虚线标识), 这类氢键互作是维系复合物稳定的重要分子间作用力, 其中氨基酸残基 GLU-232 在 RRM2 中

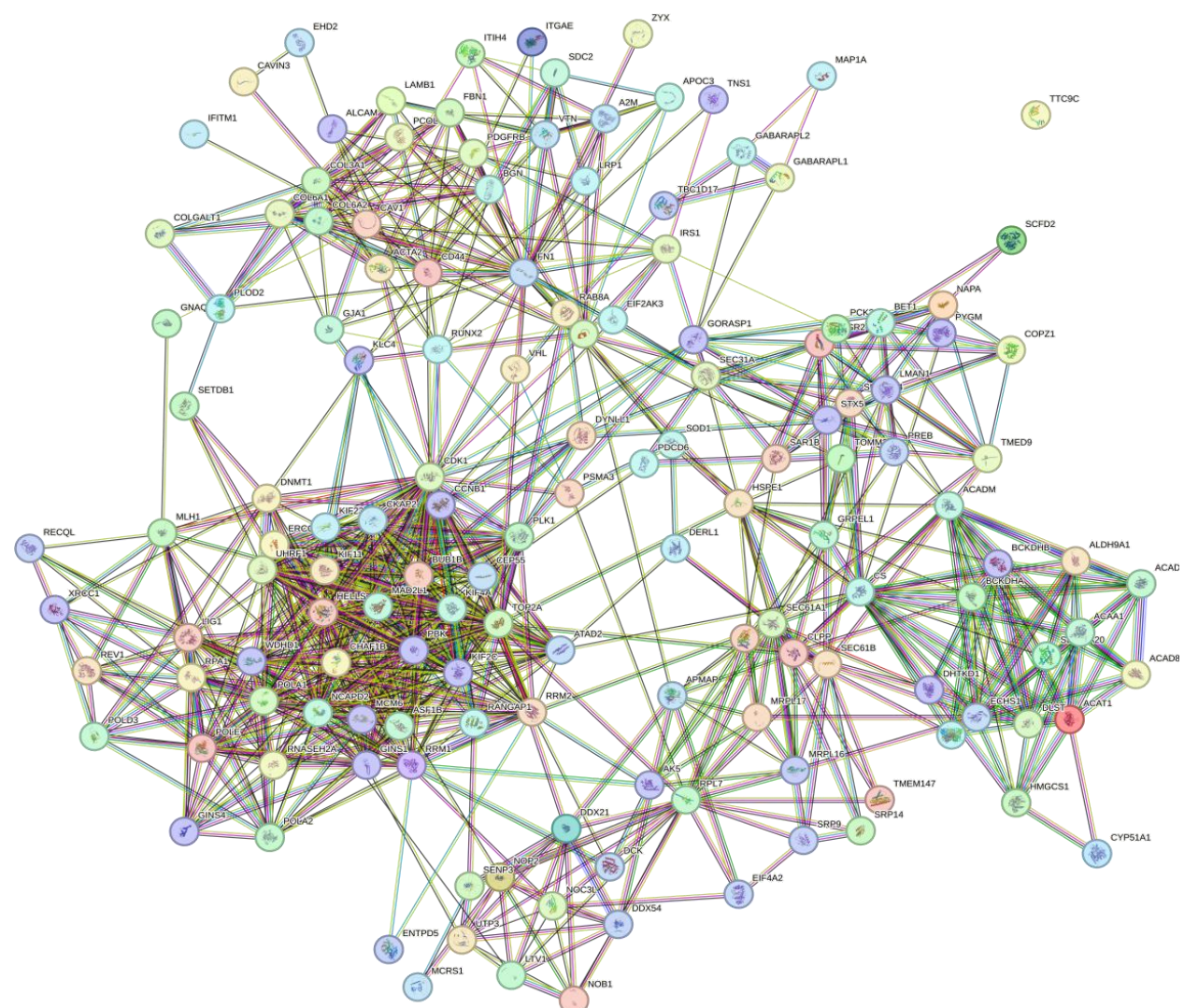


图 8 差异蛋白互作网络分析结果

Fig. 8 Analysis results of differentially expressed protein interaction network

表 1 羽扇豆醇治疗乳腺癌核心靶点互作的拓扑学参数

Table 1 Topological parameters of core target interactions in lupeol treatment of breast cancer

编号	英文名称	中文名称	度值	介数中间性	接近中心性
1	CDK1	细胞周期蛋白依赖性激酶1	40	0.15	0.50
2	TOP2A	拓扑异构酶IIα	36	0.12	0.50
3	FN1	纤连蛋白1	33	0.20	0.45
4	CCNB1	细胞周期蛋白B1	33	0.05	0.45
5	RRM2	核糖核苷酸还原酶	32	0.07	0.42
6	MCM6	微小染色体维持蛋白6	32	0.02	0.42
7	NCAPD2	凝缩蛋白II复合体亚基D2	31	0.01	0.41
8	RRM1	核糖核苷酸还原酶M1亚基	27	0.02	0.42
9	PLK1	Polo样激酶1	26	0.02	0.43
10	ATAD2	ATP依赖性染色质组装因子结构域蛋白2	24	0.04	0.40

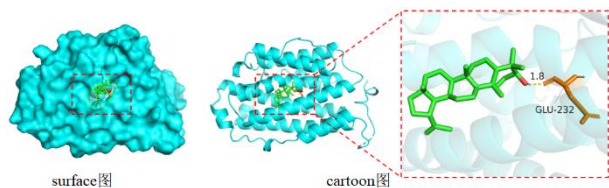


图 9 羽扇豆醇与 RRM2 蛋白分子对接 3D 可视化图

Fig. 9 3D visualization diagram of lupeol and RRM2 protein molecular docking

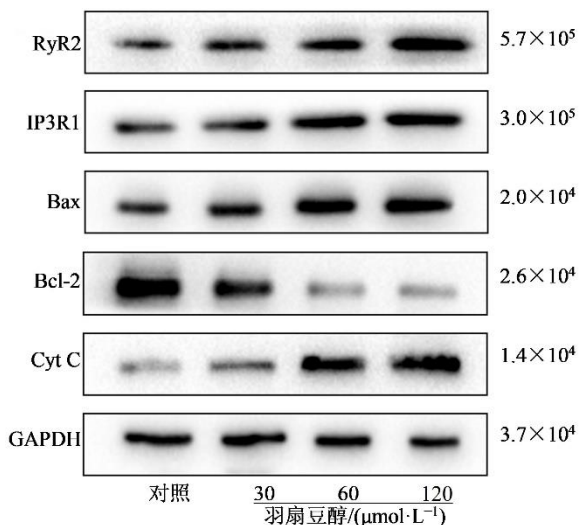
可能通过参与铁硫簇的配位、氢键网络的构建或变构调节,影响酶的催化活性和自由基生成效率。结果表明,羽扇豆醇与 RRM2 蛋白存在较稳固的结合能力,为后续探究其调控 RRM2 蛋白功能的作用机制提供了结构层面的支撑依据。

3.6 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

Ca^{2+} 主要来源于内质网释放至细胞质,其浓度升高可激活钙依赖的磷脂酶 A2,促进多不饱和脂肪酸释放,为脂质过氧化提供底物,同时可能通过干扰线粒体功能加剧 ROS 生成,协同诱导铁死亡。图 10 结果显示,与对照组比较,羽扇豆醇组 Ca^{2+} 浓度显著升高 ($P < 0.01, 0.001$)。

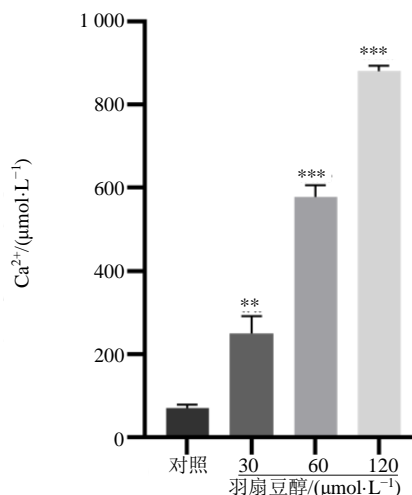
3.7 Western blotting 检测羽扇豆醇对 MCF-7 细胞中钙信号通路的影响

图 11 结果显示,与对照组比较,羽扇豆醇 60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 MCF-7 细胞中 RyR2 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01, 0.001$),IP3R1 蛋白表达呈上调趋势,从而引发钙稳态失衡;高钙环境进一步激活凋



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

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

图 11 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞中钙信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 11 Effects of lupeol on calcium signaling pathway-related proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

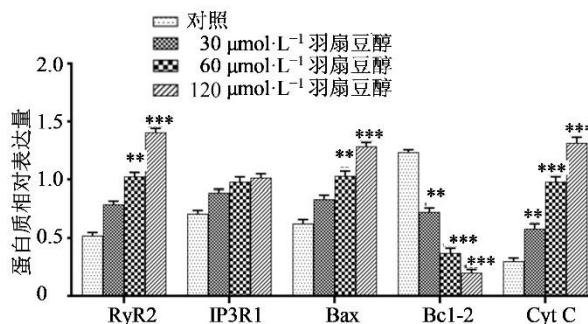
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 10 羽扇豆醇对乳腺癌 MCF-7 细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 10 Effect of lupeol on intracellular Ca^{2+} concentration in breast cancer MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

亡通路,羽扇豆醇 60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Bax、Cyt C 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01, 0.001$),各浓度组 Bcl-2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01, 0.001$),从而促进脂质过氧化底物生成、加剧线粒体氧化应激。

3.8 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞中的 MDA、SOD、GSH 和铁含量的影响

为验证羽扇豆醇诱导 MCF-7 细胞铁死亡的作用,对铁死亡核心特征指标进行检测。结果如图 12



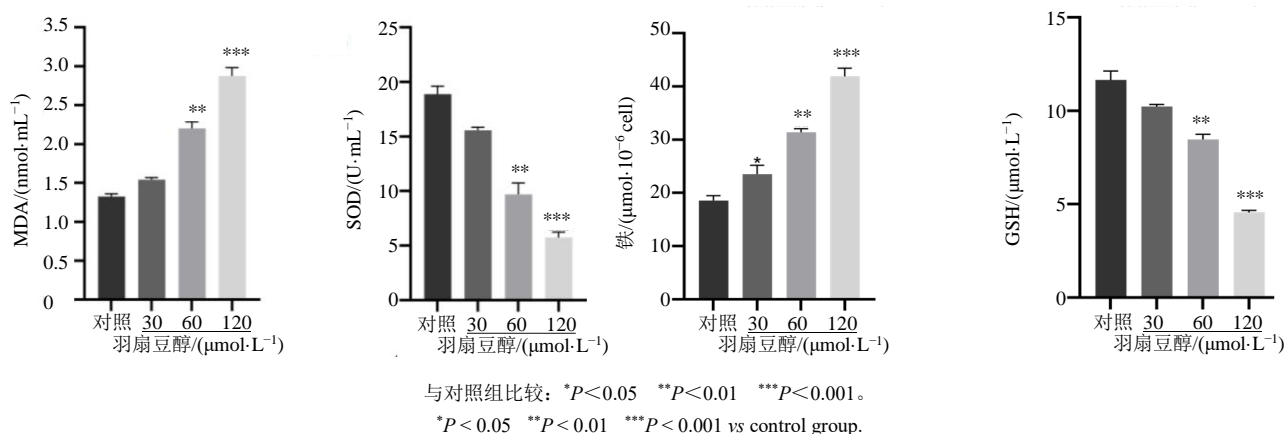


图 12 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞中的 MDA、SOD、GSH 和组织铁含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 12 Effect of lupeol on MDA, SOD, GSH and tissue iron content in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

所示,与对照组相比,羽扇豆醇 60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001),同时铁水平显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001)。

3.9 Western blotting 检测羽扇豆醇对 MCF-7 细胞中铁死亡相关蛋白表达水平的影响

为明确羽扇豆醇诱导 MCF-7 细胞铁死亡的作用机制,采用 Western blotting 检测铁死亡关键通路蛋白表达。结果如图 13 所示,经 60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 羽扇豆醇处理 48 h 后,ACSL4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001),RRM2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$ 、0.001)。

3.10 Fer-1 对羽扇豆醇诱导铁死亡作用的影响

铁死亡特异性抑制剂 Fer-1 用于进一步探讨铁

死亡是否参与羽扇豆醇的抗肿瘤作用。图 14 结果所示,与羽扇豆醇组比较, Fer-1+羽扇豆醇组的 MDA 和铁含量显著降低 ($P < 0.001$), SOD 和 GSH 水平显著升高 ($P < 0.001$),几乎恢复至对照组水平。Western blotting 结果显示,与羽扇豆醇组比较, Fer-1+羽扇豆醇组的 RRM2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$),几乎恢复至对照组水平。结果表明 Fer-1 能够抑制羽扇豆醇诱导 MCF-7 细胞发生铁死亡的特征性变化。

4 讨论

细胞凋亡作为程序性细胞死亡的一种重要形式,在生理和病理方面都发挥着关键作用^[14-16],本项研究中,通过 MTT 法对羽扇豆醇抗乳腺癌 MCF-7 细胞活性测定,不同浓度的羽扇豆醇作用于 MCF-

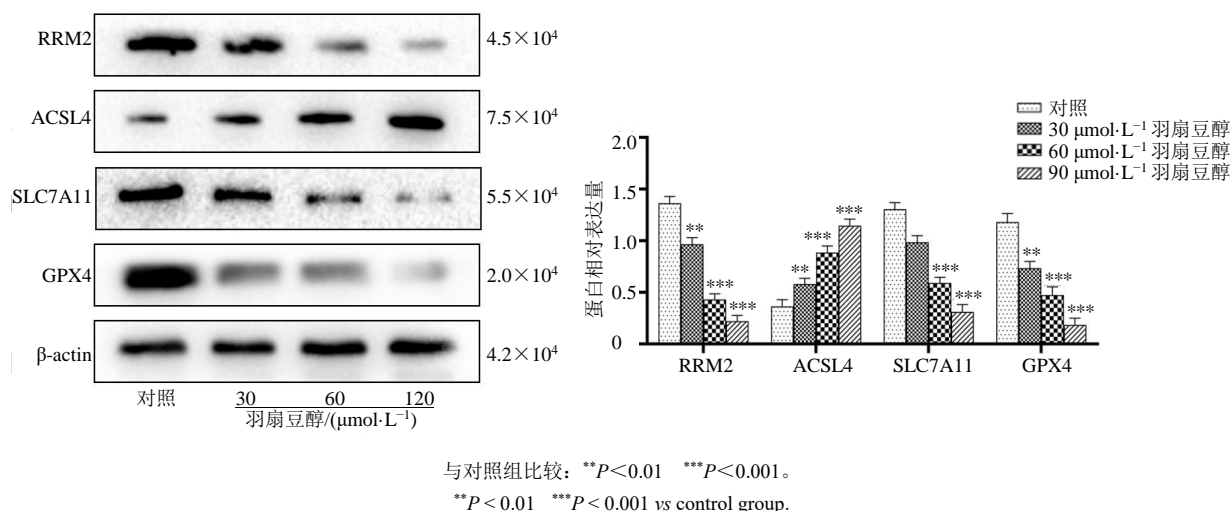
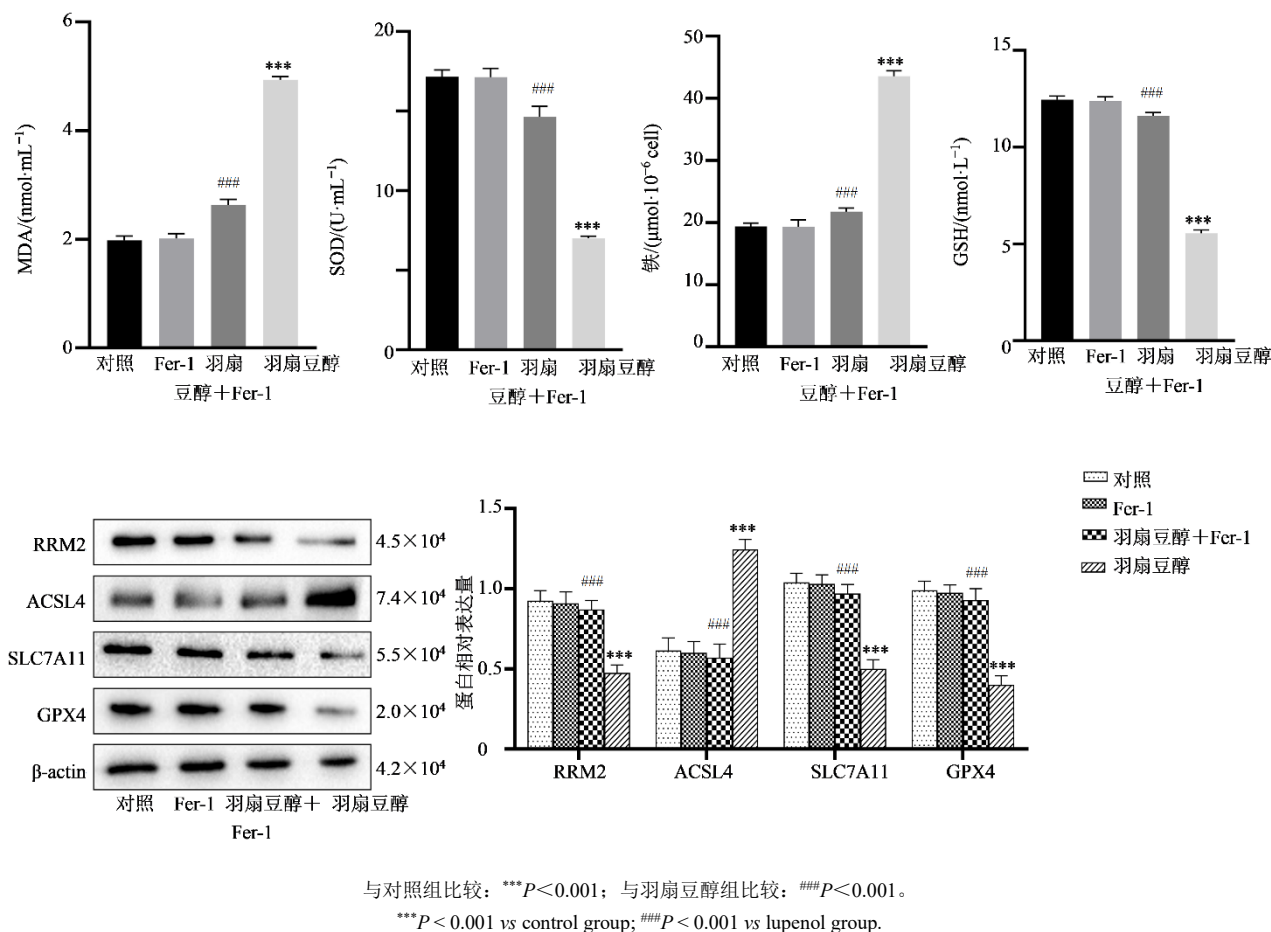


图 13 羽扇豆醇对 MCF-7 细胞中铁死亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 13 Effects of lupeol on ferroptosis-related proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图 14 Fer-1 对羽扇豆醇诱导铁死亡作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 14 Effect of Fer-1 on induction of ferroptosis by lupeol ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

7 细胞 24、48、72 h 后, 其 IC₅₀ 值分别为 (93.43 ± 1.87)、(63.02 ± 1.56)、(41.58 ± 1.23) μmol·L⁻¹。其流式细胞术结果显示随着羽扇豆醇浓度的升高, MCF-7 细胞的凋亡率与 ROS 水平均呈浓度相关性显著增加, 证实羽扇豆醇能够介导细胞凋亡。

除凋亡外, 还有多种程序性或调节性细胞死亡方式, 它们在机制和功能上各具特点, 其中铁死亡是近年来发现的一种由铁依赖性脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡的新型形式。因此, 铁死亡途径可能为抗癌药物的使用开辟一条新途径。羽扇豆醇作为天然抗肿瘤药物中的研究热点, 既往的研究表明, 羽扇豆醇可通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡和激活自噬来抑制肿瘤生长, 且副作用和毒性低^[17]。本研究通过用 TMT 标记定量蛋白组学技术检测羽扇豆醇对 MCF-7 细胞的影响, 探索其抗乳腺癌的机制, 发现了一条全新的羽扇豆醇抗肿瘤机制, 即羽扇豆醇能够以铁死亡的方式诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞死亡。

Ca²⁺是参与许多重要细胞过程调节的重要第二信使, 如增殖、分化、迁移和细胞死亡^[18]。内质网是细胞内主要的钙库, IP3R 作为内质网钙释放通道, 在调节内质网 Ca²⁺稳态处于核心地位, IP3R 的过度激活, 会致使内质网钙库过度释放 Ca²⁺, 胞质内 Ca²⁺浓度急剧升高。过量的 Ca²⁺会通过线粒体钙单向转运体 (MCU) 大量涌入线粒体, 干扰线粒体的正常功能, 线粒体摄取过多 Ca²⁺后, 电子传递链受到抑制, ROS 生成大幅增加, 这些过量的 ROS 会攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸 (PUFAs), 引发脂质过氧化反应^[19-20]。有研究表明, 在铁死亡过程中, Ca²⁺在内质网与线粒体之间的转移明显增加, 且对铁死亡的执行起到关键作用^[21]。本研究结果显示羽扇豆醇组 Ca²⁺浓度增加, RyR2、IP3R1、Bax、Cyt C 表达上升, Bcl-2 呈下降趋势, 提示羽扇豆醇可能通过诱导 MCF-7 细胞 Ca²⁺超载, 从而增加铁死亡的敏感性。

脂质过氧化是铁死亡的重要标志, 其中羟基自

由基(OH·)会攻击脂质(尤其是PUFAs)的碳碳双键^[22],引发链式反应,最终生成MDA、4-羟基壬烯醛(HNE)和F2-异前列腺素等产物^[23]。OH·的产生是脂质过氧化的关键环节:SOD将ROS转化为过氧化氢,在还原铁(Fe²⁺)存在下通过芬顿反应生成OH[·]^[24]。ACSL4是长链酰基CoA合成酶ACSL家族的成员,参与脂肪酸代谢,可催化脂质过氧化物的生成,是铁死亡的关键预测因子^[25]。同时,脂质过氧化受GSH抗氧化系统严格调控,该系统由GSH、GPX和戊二氧还蛋白(GRX)组成^[26-27]。其中,SLC7A11作为胱氨酸/谷氨酸反向转运体(System xc⁻)的核心亚基,通过摄取胱氨酸为GSH合成提供限速底物,而RRM2则通过结合谷胱甘肽合成酶(GSS)促进GSH的生物合成,两者协同维持细胞内GSH水平,以支撑GPX4的抗氧化活性^[28-30],分子对接结果显示羽扇豆醇与RRM2蛋白有良好的结合能力。GPX4作为调控铁死亡的核心蛋白,能够使脂质过氧化物中的过氧键(PLOOH)还原为羟基(PLOH),以防止过氧化物的积累。System xc⁻/GSH/GPX4是拮抗铁死亡的重要抗氧化轴。SLC7A11/GPX4通路是诱导乳腺癌细胞发生铁死亡的核心通路之一^[31],研究结果显示,羽扇豆醇组呈现出典型的铁死亡激活特征:SOD活性与GSH含量显著下降(分别对应氧化应激增强与抗氧化能力削弱),MDA与铁离子水平同步升高(提示脂质过氧化加剧与芬顿反应底物蓄积),且Western blotting证实RRM2、SLC7A11、GPX4蛋白表达量显著下调,加入Fer-1后,Fer-1+羽扇豆醇组SOD活性恢复,MDA、Fe²⁺、GSH含量也几乎恢复至对照组水平,同时RRM2、SLC7A11、GPX4蛋白表达量也显著恢复。上述研究数据证实,羽扇豆醇能够诱导人乳腺癌MCF-7细胞发生铁死亡,其机制可能与RRM2低表达及SLC7A11/GPX4通路被抑制密切相关,两者通过协同破坏GSH的合成与利用,共同削弱细胞对脂质过氧化的防御能力:RRM2低表达直接减少GSH的合成储备,而SLC7A11/GPX4通路被抑制则阻断胱氨酸摄取(GSH合成原料)并丧失脂质过氧化物清除功能,最终触发铁死亡。

综上所述,羽扇豆醇在体外可显著抑制MCF-7细胞增殖并诱导细胞凋亡。本研究首次通过实验数据揭示,羽扇豆醇能够诱导乳腺癌MCF-7细胞发生铁死亡,其作用机制可能与RRM2低表达及

SLC7A11/GPX4通路被抑制密切相关。本研究存在不足之处仅在MCF-7细胞系中验证,缺乏其他乳腺癌亚型(如三阴性乳腺癌)的实验数据;且未开展体内实验验证羽扇豆醇的抗肿瘤效果及安全性,后续需构建裸鼠移植瘤模型补充验证,使分析更具体。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389(10074): 1134-1150.
- [2] Maughan K L, Lutterbie M A, Ham P S. Treatment of breast cancer [J]. Am Fam Physician, 2010, 81(11): 1339-1346.
- [3] 乔文姝, 赵海田, 姚磊. 羽扇豆烷型五环三萜生物活性研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41(13): 235-241.
Qiao W S, Zhao H T, Yao L. Advances in understanding the biological activity of lupinane-type pentacyclic triterpenoids [J]. Food Sci, 2020, 41(13): 235-241.
- [4] 张昕. 羽扇豆醇通过促进自噬抑制三阴性乳腺癌的作用机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
Zhang X. Study on the mechanism of lupin alcohol inhibiting triple negative breast cancer by promoting autophagy [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2023.
- [5] 曹文富, 潘年松, 李颖. 羽扇豆醇抑制乳腺癌 MCF-7 增殖迁移和侵袭及机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 156-159.
Cao W F, Pan N S, Li Y. Inhibitory effects and mechanisms of lupeol on proliferation, migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(10): 156-159.
- [6] 王明, 崔红霞, 孙超, 等. 羽扇豆醇对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭转移作用及机制研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(4): 558-562.
Wang M, Cui H X, Sun C, et al. Effect of lupeol on migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin, 2016, 51(4): 558-562.
- [7] Lei G, Zhuang L, Gan B Y. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22: 381-396.
- [8] Bertrand R L. Iron accumulation, glutathione depletion, and lipid peroxidation must occur simultaneously during ferroptosis and are mutually amplifying events [J]. Med Hypotheses, 2017, 101: 69-74.
- [9] Guo J P, Xu B F, Han Q, et al. Ferroptosis: A novel anti-tumor action for cisplatin [J]. Cancer Res Treat, 2018,

- 50(2): 445-460.
- [10] Ma S, Henson E S, Chen Y, et al. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2307.
- [11] Yamaguchi Y, Kasukabe T, Kumakura S. Piperlongumine rapidly induces the death of human pancreatic cancer cells mainly through the induction of ferroptosis [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3): 1011-1022.
- [12] Huang Y L, Wang S W, Ke A W, et al. Ferroptosis and its interaction with tumor immune microenvironment in liver cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(1): 188848.
- [13] Hutchinson-Bunch C, Sanford J A, Hansen J R, et al. Assessment of TMT labeling efficiency in large-scale quantitative proteomics: The critical effect of sample pH [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(19): 12660-12666.
- [14] Bedoui S, Herold M J, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 678-695.
- [15] Green D R. The coming decade of cell death research: Five riddles [J]. *Cell*, 2019, 177(5): 1094-1107.
- [16] Kist M, Vucic D. Cell death pathways: Intricate connections and disease implications [J]. *EMBO J*, 2021, 40(5): e106700.
- [17] Che S T, Wu S, Yu P. Lupeol induces autophagy and apoptosis with reduced cancer stem-like properties in retinoblastoma via phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin inhibition [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(2): 208-215.
- [18] Sukumaran P, Nascimento Da Conceicao V, Sun Y Y, et al. Calcium signaling regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2125.
- [19] Peng T I, Jou M J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1201: 183-188.
- [20] Baev A Y, Vinokurov A Y, Novikova I N, et al. Interaction of mitochondrial calcium and ROS in neurodegeneration [J]. *Cells*, 2022, 11(4): 706.
- [21] Zhang Z L, Zhou H, Gu W J, et al. CGI1746 targets σ 1R to modulate ferroptosis through mitochondria-associated membranes [J]. *Nat Chem Biol*, 2024, 20(6): 699-709.
- [22] Li J, Cao F, Yin H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.
- [23] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. *Anal Biochem*, 2017, 524: 13-30.
- [24] Wen X, Wu J M, Wang F T, et al. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 402-410.
- [25] Doll S, Proneth B, Tyurina Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98.
- [26] Lv H H, Zhen C X, Liu J Y, et al. Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3150145.
- [27] Bajic V P, Van Neste C, Obradovic M, et al. Glutathione “redox homeostasis” and its relation to cardiovascular disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019(1): 5028181.
- [28] Koppula P, Zhuang L, Gan B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.
- [29] 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.
- [30] Yang Y Y, Lin J F, Guo S S, et al. RRM2 protects against ferroptosis and is a tumor biomarker for liver cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 587.
- [31] He D, Tan X N, Li L P, et al. Brazilin actuates ferroptosis in breast cancer cells via p53/SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. *Chin J Integr Med*, 2024, 30(11): 1001-1006.