

桔梗皂苷 D 诱导非小细胞肺癌铁死亡的作用及机制

王琴琴^{1,2}, 刘丽娜², 廖莲婷², 苑仁祎坤², 杨世林^{1,2*}, 高红伟^{2*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330004

2. 广西中医药大学 中医药壮瑶医药研究院, 广西 南宁 530020

摘要:目的 探讨桔梗皂苷 D (PD) 诱导非小细胞肺癌 (NSCLC) 铁死亡的作用及机制。方法 体外实验采用 A549 细胞, 添加 PD (5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 6 h, 通过 MTT 法及克隆形成实验检测细胞增殖能力; 利用流式细胞术结合特异性荧光探针检测细胞内活性氧 (ROS); 采用试剂盒测定丙二醛 (MDA) 含量; 利用免疫荧光法检测细胞内 Fe^{2+} 和脂质过氧化物水平; 通过 Western blotting 法检测铁死亡相关蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、长链酰基辅酶 A 合成酶 4 (ACSL4)、铁蛋白重链 (FTH1)、核受体共激活因子 4 (NCOA4) 的表达; 并使用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 和铁螯剂 DFO 验证 PD 的作用途径。体内实验采用 Lewis 肺癌 (LLC) 荷瘤 C57BL/6J 小鼠模型, 观察 PD (2、4、8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对荷瘤小鼠肿瘤生长、体质量及血液学指标的影响, 并对肿瘤组织进行病理学分析, 同时通过蛋白质免疫印迹法检测肿瘤组织中铁死亡相关蛋白的表达。结果 PD 抑制 A549 细胞活力与增殖 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 诱导细胞内 ROS 积累、MDA 含量升高、 Fe^{2+} 水平升高、脂质过氧化物增加 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), Fer-1 和 DFO 可逆转 PD 的抑制作用 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。此外, PD 显著下调 GPX4 与 FTH1 蛋白表达, 上调 ACSL4 与 NCOA4 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。体内实验中, PD 各剂量组 (2、4、8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 均能显著抑制 LLC 荷瘤小鼠肿瘤生长, 且未引起明显不良反应; 肿瘤组织中铁死亡相关蛋白表达趋势与体外一致。结论 PD 可通过诱导铁死亡抑制 NSCLC 细胞体内外生长, 其机制可能与调节 GPX4/FTH1 抗氧化轴及 ACSL4/NCOA4 介导的脂质代谢、铁存储蛋白降解有关。

关键词: 桔梗皂苷 D; 铁死亡; 非小细胞肺癌; 脂质过氧化; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)04-1166-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.04.007

Effect and mechanism of platycodin D in inducing ferroptosis in non-small cell lung cancer

WANG Qinqin^{1,2}, LIU Lina², LIAO Lianting², YUAN Renyikun², YANG Shilin^{1,2}, GAO Hongwei²

1. National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Traditional Chinese Medicine Solid Preparations, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Zhuang and Yao Medicine, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530020, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of platycodin D (PD) in inducing ferroptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** *In vitro* experiments were conducted using A549 cells, with PD (5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) added and incubated for 6 h. Cell proliferation was detected by MTT assay and colony formation assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry combined with specific fluorescent probes. Malondialdehyde (MDA) content was measured using a kit. Intracellular Fe^{2+} and lipid peroxide levels were detected by immunofluorescence. The expression of ferroptosis-related proteins, glutathione peroxidase 4 (GPX4), longS-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4), ferritin heavy chain (FTH1), and nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4), was detected by Western blotting. The iron death inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1) and the iron chelator DFO were used to verify the action pathway of PD. *In vivo* experiments were conducted using a Lewis lung cancer (LLC) tumor-

收稿日期: 2025-12-26

基金项目: 广西青年岐黄学者培育项目 (GXQH202408); 广西青年科技人才托举工程项目 (GXYES2025031)

作者简介: 王琴琴, 女, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: 18329759158@163.com

*通信作者: 杨世林, 男, 教授, 主要从事中药新药研发。E-mail: yangshilin@suda.edu.cn

高红伟, 男, 研究员, 主要从事中药抗炎与免疫机制研究。E-mail: gaohongwei06@126.com

bearing C57BL/6J mouse model. The effects of PD (2, 4, 8 mg·kg⁻¹) on tumor growth, body weight, and hematological parameters of tumor-bearing mice were observed, and pathological analysis of tumor tissues was performed. The expression of ferroptosis-related proteins in tumor tissues was detected by Western blotting. **Results** PD inhibited the viability and proliferation of A549 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), induced the accumulation of intracellular ROS, increased MDA content, elevated Fe²⁺ levels, and increased lipid peroxides ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Fer-1 and DFO could reverse the inhibitory effect of PD ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Additionally, PD significantly downregulated the expression of GPX4 and FTH1 proteins and upregulated the expression of ACSL4 and NCOA4 proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In the *in vivo* experiments, all doses of PD (2, 4, 8 mg·kg⁻¹) significantly inhibited tumor growth in LLC tumor-bearing mice without causing obvious toxic side effects. The expression trend of ferroptosis-related proteins in tumor tissues was consistent with that *in vitro*. **Conclusion** PD inhibits the growth of NSCLC cells both *in vitro* and *in vivo* by inducing ferroptosis. The mechanism may involve the regulation of the GPX4/FTH1 antioxidant axis and ACSL4/NCOA4 mediated lipid metabolism and iron storage protein degradation.

Key words: platycodin D; ferroptosis; non-small cell lung cancer; lipid peroxidation; glutathione peroxidase 4 (GPX4)

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤，严重威胁人类健康^[1-2]。非小细胞肺癌（NSCLC）约占肺癌总数的 85% 以上，多数患者确诊时已处于晚期，丧失手术机会^[3-4]。目前晚期 NSCLC 的治疗以铂类化疗、靶向治疗及免疫检查点抑制剂为主，但常伴随耐药性与毒性反应，影响患者生存质量^[5-7]。因此，寻找高效低毒的新型抗 NSCLC 药物已成为重要研究方向。

近年来，铁死亡作为一种新型调节性细胞死亡方式，在肿瘤治疗中展现出广阔前景^[8-11]。铁死亡以铁依赖性脂质过氧化物累积、抗氧化防御系统受损及线粒体形态改变为主要特征^[12-15]。研究显示，诱导铁死亡可显著抑制肺癌的进展、转移及耐药。许多肿瘤细胞（包括 NSCLC）因代谢活跃而对铁死亡敏感，这为肺癌治疗提供了新策略^[8]。目前，多种中药活性成分（如没食子酸、黄芩苷等）已被证实可通过诱导铁死亡发挥抗肿瘤作用^[16-18]，体现了中医药在现代肿瘤研究中的潜力。

中药具有多靶点、低毒性的优势，是抗肿瘤药物研发的重要资源^[19]。皂苷类成分在肺癌治疗中显示出多重作用，包括诱导凋亡、抑制增殖与侵袭、逆转耐药、调节免疫微环境以及促进铁死亡等^[20-21]。桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC. 的干燥根，性苦、辛，平，归肺经，具有宣肺、利咽、祛痰、排脓等功效，临床常用于咳嗽痰多、咽喉肿痛等肺系疾病^[22]。桔梗皂苷 D (PD) 是中药桔梗的主要活性成分，具有抗炎、抗氧化、免疫调节及广谱抗肿瘤作用^[23-25]。尽管已有研究提示 PD 具有多靶点抗肿瘤活性，但其是否通过诱导铁死亡抑制 NSCLC 尚不清楚。

基于此，本研究对 PD 诱导铁死亡在抗 NSCLC

中的作用及分子机制进行考察，通过体内外实验评估 PD 对铁死亡关键标志物的影响，并利用抑制剂验证其特异性，以明确 PD 诱导铁死亡的能力及其在抗 NSCLC 中的作用，为 PD 的抗肺癌机制提供科学依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

48 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠，8 周龄，体质量 20~22 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006，动物饲养于室温 22~25 °C、相对湿度 45%~55%、12 h 昼夜循环光照的环境中，自由进食饮水。动物实验经广西中医药大学伦理委员会批准（批准号 GXTCMU-EC20250805-410）。

人 NSCLC A549 细胞及小鼠 Lewis 肺癌 LLC 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与主要试剂

PD (货号 GLP0009, 质量分数 99.5%) 购自成都普瑞法科技开发有限公司；噻唑蓝 (MTT, 货号 M2128) 购自 Sigma Aldrich 公司；DCFH2-DA (货号 HY-126793)、z-DEVD-fmk (货号 HY-16658B)、坏死抑素-1 (necrostatin-1, Nec-1, 货号 HY-15760)、DFO (货号 HY-D0903) 购自美国 MCE 公司；ferrostatin-1 (Fer-1, 货号 SML0583) 购自美国 Sigma 公司；胎牛血清 (货号 2364724)、青链霉素 (货号 01118)、RMPI-1640 (货号 31800022)、DMEM 培养基 (货号 8123117)、0.25% 胰酶-EDTA (货号 2666516) 购自美国 Gibco 公司；丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (货号 A003-12) 购自南京建成生物工程研究所；FerroOrange 探针 (货号 F374) 购自日本株式会社仪器同仁化学研究所；C11-BODIPY 探

针(货号 GC40165)购自美国 GlpBio 公司;长链酰基辅酶 A 合成酶 4(ACSL4, 货号 DF12141)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4, 货号 DF6701)、核受体共激活因子 4(NCOA4, 货号 DF4255)、铁蛋白重链(FTH1, 货号 DF6278)抗体购自 Affinity 公司;HRP 标记的 IgG 二抗(货号 7074P2)、GAPDH(货号 14C10)购自美国 CST 公司;Ki67(货号 ET1609-34)抗体购自华安生物公司。

1.3 主要仪器

BC-5000Vet 型 Mindray 血常规检测仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);BX53 型病理图像分析仪(日本 Olympus 公司);Cytation 5 型细胞成像酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);小动物肿瘤测量仪(美国 Bioptron 公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 细胞培养 A549 细胞用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 RPMI 1640 培养基培养;LLC 细胞用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 培养基培养。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养^[26]。

2.1.2 细胞活力检测 A549 细胞以每孔 5×10³ 个接种于 96 孔板,贴壁 24 h 后,用 PD(5、10、20 μmol·L⁻¹)处理 3、6、12、24 h,对照组不加药,空白组不接种细胞。

A549 细胞以每孔 5×10³ 个接种于 96 孔板,贴壁 24 h 后,设置 PD(5、10、20 μmol·L⁻¹)组、PD(5、10、20 μmol·L⁻¹) + Nec-1(20 μmol·L⁻¹)组、PD(5、10、20 μmol·L⁻¹) + z-DEVD-fmk(20 μmol·L⁻¹)组,PD 和 Nec-1/z-DEVD-fmk 同时给药,处理 6 h,对照组不加药,空白组不接种细胞。

A549 细胞以每孔 5×10³ 个接种于 96 孔板,贴壁 24 h 后,设置 PD(5、10、20 μmol·L⁻¹)组、PD(5、10、20 μmol·L⁻¹) + Fer-1(20 μmol·L⁻¹)组、PD(5、10、20 μmol·L⁻¹) + DFO(100 μmol·L⁻¹)组,PD 和 Fer-1/DFO 同时给药,处理 6 h,对照组不加药,空白组不接种细胞。

每孔加入 MTT 溶液孵育 4 h,弃上清,加入二甲基亚砜(DMSO)溶解甲臞,用酶标仪测定 570 nm 处吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.3 克隆形成实验 A549 细胞以每孔 1×10³ 个接种于 6 孔板,贴壁 24 h 后,培养至肉眼可见克隆

形成后,用 PD(5、10、20 μmol·L⁻¹)处理,对照组不加药。继续培养 6 h,弃培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色,拍照并计数克隆数^[27]。

2.1.4 MDA 含量检测 A549 细胞以每孔 2×10⁵ 个接种于 6 孔板,分组给药同“2.1.3”项,6 h 后收集细胞,按试剂盒说明书操作,测定 MDA 含量^[28]。

2.1.5 ROS 水平检测 A549 细胞以每孔 5×10⁴ 个接种于 12 孔板,分组给药同“2.1.3”项,给药 6 h 后加入 DCFH-DA 探针,避光孵育 30 min, PBS 清洗,胰酶消化,流式细胞仪检测荧光强度^[29]。

2.1.6 Fe²⁺水平和脂质过氧化物水平检测 A549 细胞接种及给药同“2.1.3”项,给药 6 h 后分别加入 FerroOrange 探针、C11-BODIPY 探针,避光孵育 30 min,荧光显微镜下观察并拍照^[30]。

2.1.7 Western blotting 检测蛋白表达 A549 细胞接种及分组给药同“2.1.3”项,给药 6 h 后裂解提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、封闭后,分别孵育一抗(GPX4、ACSL4、FTH1、NCOA4、GAPDH)及 HRP 标记二抗,ECL 显影后于凝胶成像系统中分析条带灰度值^[31]。

2.2 体内实验

2.2.1 荷瘤模型建立 取对数期 LLC 细胞,重悬于含 5%血清 DMEM 中,以每只 1×10⁶ 个细胞接种于 C57BL/6J 小鼠背部皮下^[32]。

2.2.2 分组与给药 接种 5 d 后,将荷瘤小鼠随机分为模型组、顺铂(阳性药,2 mg·kg⁻¹,每 3 天 1 次)组和 PD 低、中、高剂量(2、4、8 mg·kg⁻¹)组,模型组每天给予相应体积的 0.9%氯化钠溶液,每组 8 只,ip 给药,连续 14 d。

2.2.3 指标观察 隔天记录小鼠体质量,并用小动物肿瘤测量仪检测肿瘤体积。

2.2.4 血常规分析 给药结束后,取小鼠眼眶外周血,用血常规检测仪对小鼠血液中的中性粒细胞、淋巴细胞、红细胞水平进行检测。

2.2.5 脏器及肿瘤质量检测 给药结束后,剥离小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、肿瘤并对其称质量、记录。

2.2.6 组织病理学分析 组织经 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片,分别进行 HE 染色与 Ki67 免疫组化染色,于光学显微镜下观察并拍照^[33]。

2.2.7 肿瘤组织 Western blotting 检测 取瘤组织提

取蛋白,方法同“2.1.7”,检测 GPX4、ACSL4、FTH1、NCOA4 蛋白表达。

2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 组间两两比较采用 Dunnett's 检验。

3 结果

3.1 PD 抑制 A549 细胞活力与增殖

为评价 PD 对 NSCLC 细胞的体外作用, 采用 MTT 法检测不同浓度 PD (0、5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 3、6、12、24 h 对 A549 细胞活力的影响。结

果显示, PD 处理 6 h 可以浓度相关性方式显著抑制 A549 细胞活力, 故后续相关实验均选定 6 h 作为 PD 的统一处理时间。与对照组相比, PD (5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 6 h 后, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 经 PD (5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 6 h 显著抑制 A549 细胞的集落形成能力, 集落数目明显减少 ($P < 0.05$ 、0.001), 克隆形成实验进一步证实 PD 对细胞增殖能力的抑制作用。坏死性凋亡抑制剂 Nec-1 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和凋亡抑制剂 z-DEVD-fmk (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 未逆转 PD 引起的细胞活力下降 ($P < 0.05$)。结果 (图 1) 表明, PD 能有效抑制 A549 细胞的活力与增殖。

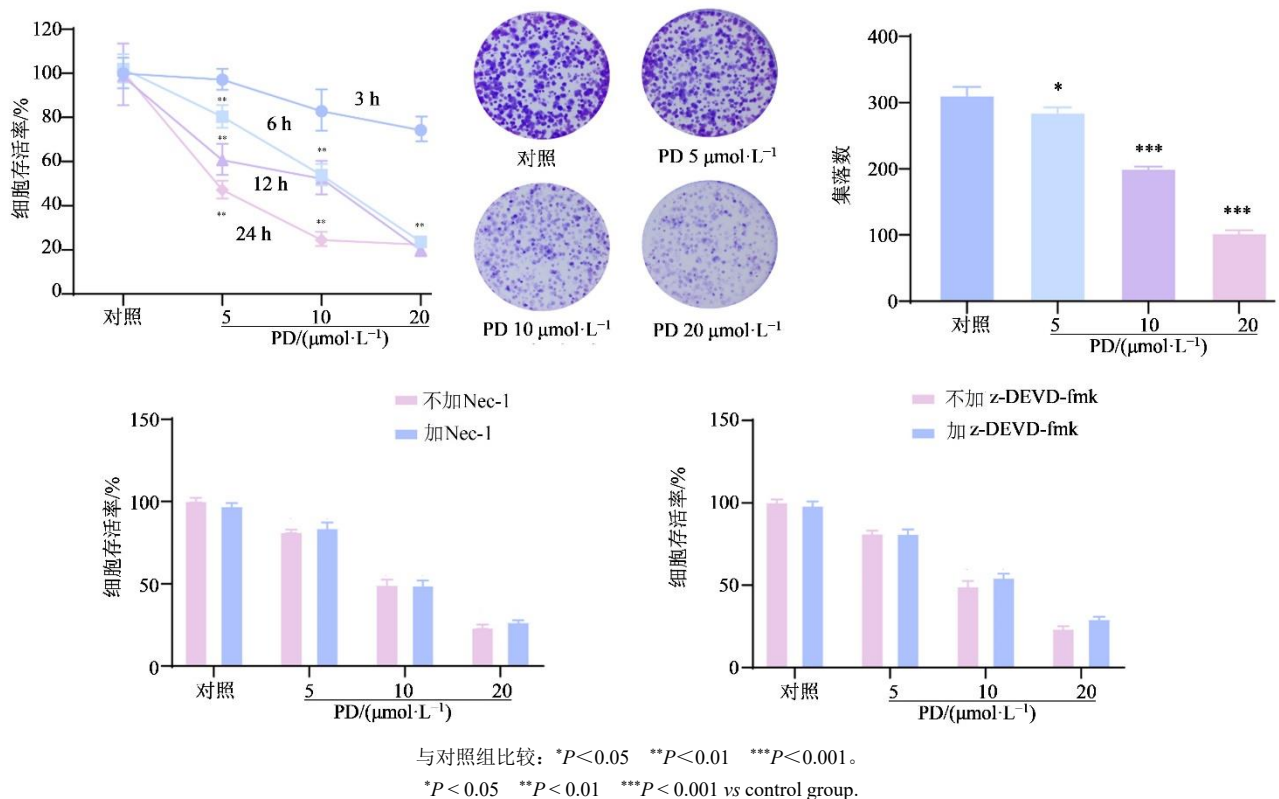


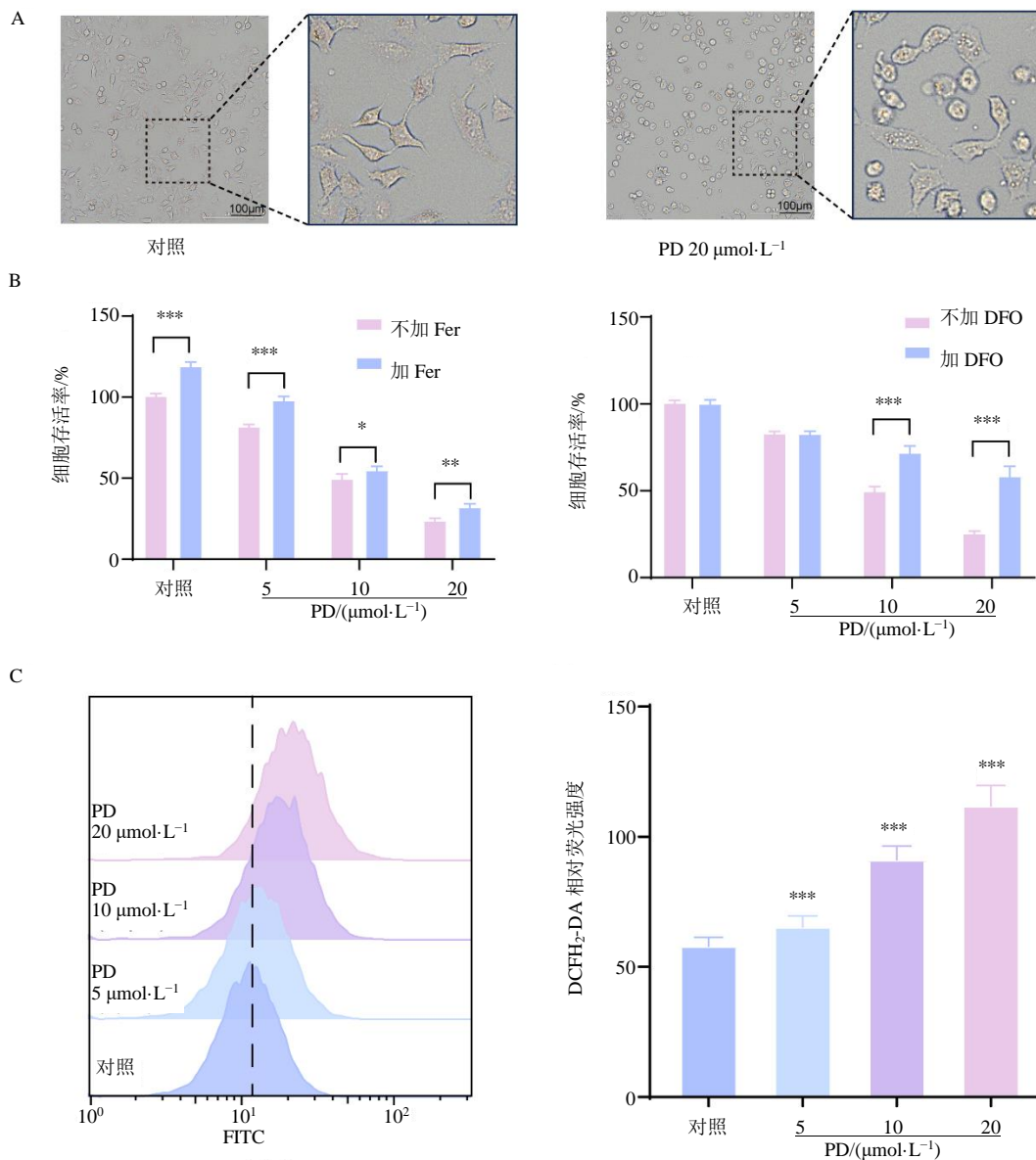
图 1 PD 对 A549 的活力与增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 PD inhibited viability and proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 PD 诱导 A549 细胞发生铁死亡

为明确 PD 是否通过诱导铁死亡发挥作用, 本研究首先观察了 PD 对细胞形态的影响。形态学观察显示 (图 2-A), 经 PD (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 6 h 后, A549 细胞出现胞质收缩、膜气泡状突起等铁死亡特征性形态改变。机制验证实验显示, 铁死亡抑制剂 Fer-1 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和铁螯合剂 DFO (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 能显著逆转 PD 引起的细胞活力下降 ($P < 0.05$ 、

0.01、0.001, 图 2-B)。进一步检测显示, 与对照组比较, PD 处理可诱导 A549 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$, 图 2-C)、MDA 含量增加 ($P < 0.05$ 、0.001, 图 3-A) 及 Fe^{2+} 荧光强度增强 ($P < 0.001$, 图 3-B、C)。此外, 通过 C11-BODIPY 探针检测脂质过氧化水平发现, PD 处理组细胞的氧化态 (绿色) 荧光强度显著增强, 而还原态 (红色) 荧光强度相应减弱 (图 3-D), 表明 PD 诱导了显著的脂质



A-PD 对 A549 细胞形态影响; B-A549 细胞活力, 与不加 Fer 或不加 DFO 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; C-流式细胞术检测 ROS 水平, 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-Effect of PD on morphology of A549 cells; B-Viability of A549 cells, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs group without Fer or DFO; C-Detection of ROS levels by flow cytometry, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 2 PD 诱导 A549 细胞发生铁死亡 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 PD induced ferroptosis in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

过氧化。以上系列结果从形态、生化及脂质过氧化水平等多个维度证实, PD 通过诱导铁死亡抑制 A549 细胞生长。

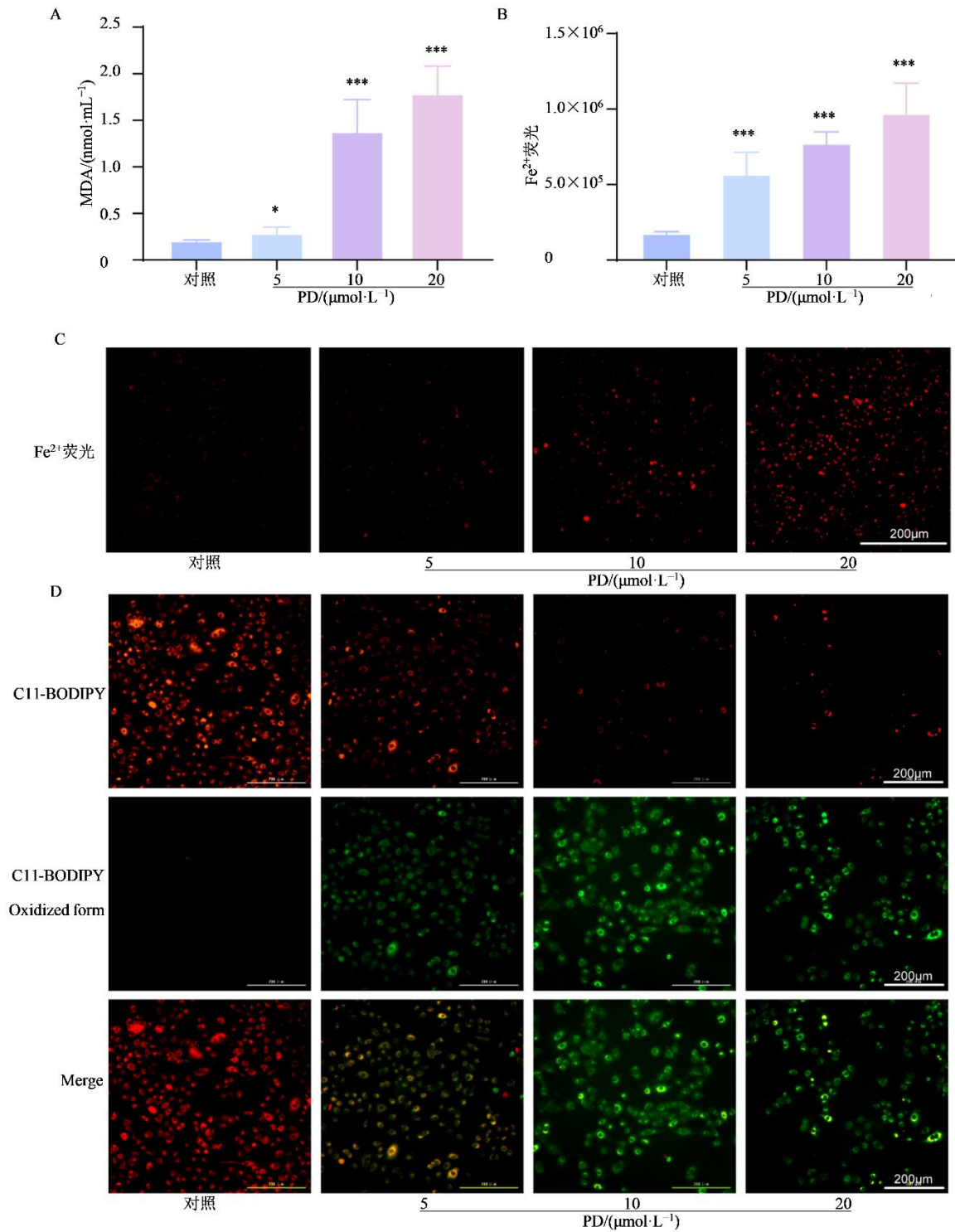
3.3 PD 对 A549 细胞铁死亡相关信号通路关键蛋白的影响

Western blotting 检测铁死亡相关蛋白表达, 结果如图 4 显示, 与对照组比较, PD 处理显著下调了抗氧化防御系统中的关键蛋白 GPX4 和铁存

储蛋白 FTH1 的表达 ($P < 0.001$), 同时, PD 上调了脂质代谢相关酶 ACSL4 和铁蛋白自噬接头蛋白 NCOA4 的表达 ($P < 0.001$)。表明 PD 可能通过抑制 GPX4/FTH1 抗氧化轴, 并促进 ACSL4/NCOA4 介导的脂质代谢与铁存储蛋白降解, 从而诱导铁死亡。

3.4 PD 抑制 LLC 荷瘤小鼠移植瘤的生长

为评价 PD 的体内抗肿瘤活性, 本研究构建了



A-细胞内 MDA 水平; B、C-FerroOrange 检测 Fe^{2+} 荧光; D-C11-BODIPY 检测脂质过氧化物荧光 (红色-还原态; 绿色-氧化态)。与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

A-Intracellular MDA level; B, and C-Detection of Fe^{2+} fluorescence by FerroOrange; D-Detection of lipid peroxide fluorescence by C11-BODIPY. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 3 PD 诱导 A549 细胞发生铁死亡作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 PD induced ferroptosis in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

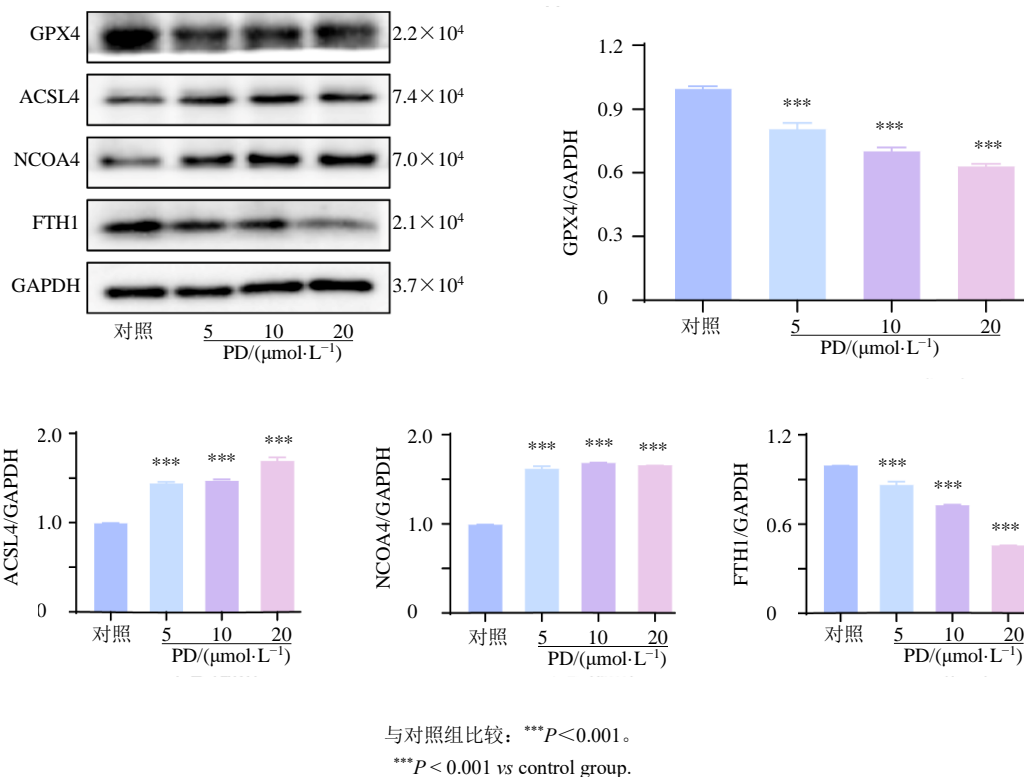


图 4 PD 对 A549 细胞铁死亡关键蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of PD on expression of key ferroptosis-related proteins in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

C57BL/6J 小鼠 LLC 皮下移植瘤模型。如图 5 所示, 与模型组比较, PD 低、中、高剂量组 (2、4、8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 及顺铂 (2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 均能显著抑制肿瘤生长, 给药 14 d 后肿瘤体积和瘤质量均呈剂量相关性减小 ($P < 0.05, 0.001$)。实验结束时, PD 高剂量组的肿瘤体积和质量最小, 抑制效果最显著。结果表明 PD 能有效减轻肿瘤负荷。

3.5 PD 对 LLC 荷瘤小鼠的安全性

为评估 PD 的体内安全性, 本研究系统监测了治疗期间小鼠的全身性反应。如图 6 所示, 在为期 14 d 的给药过程中, PD 各剂量组 (2、4、8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 及顺铂组体质量未下降, 说明 PD 在实验剂量下未影响动物的基本生理状态; 血常规分析结果显示, 荷瘤模型组小鼠的中性粒细胞与淋巴细胞比值显著高于对照组 ($P < 0.001$), 同时伴有红细胞计数的降低 ($P < 0.001$), 此现象为肿瘤进展伴随的慢性炎症与消耗状态, 而 PD 各剂量组的中性粒细胞与淋巴细胞比值及红细胞计数与模型组相比均显著逆转 ($P < 0.001$), 这表明 PD 治疗改善了肿瘤引起的造血系统紊乱或全身性炎症。脏器指数分析结果显示, 各组小鼠主要脏器 (心、肝、脾、肺、肾、脑)

系数均保持稳定, 组间无显著差异。对上述脏器的 HE 染色组织学观察进一步证实, 且镜下未见药物相关的病理性损伤。PD 在有效抑制肿瘤生长的剂量范围内, 未表现出明显的血液学毒性或主要脏器损伤, 安全性良好。

3.6 PD 抑制 Lewis 移植瘤小鼠肿瘤生长并诱导其发生铁死亡

为评估 PD 对肿瘤组织的直接作用, 本研究从组织病理学、细胞增殖及分子表达 3 个层面进行研究。如图 7 所示, HE 染色显示, 模型组肿瘤细胞密集, 核分裂现象多见, 而 PD 各剂量组肿瘤组织出现不同程度坏死, 细胞排列疏松。免疫组化检测增殖标志物 Ki67 显示, PD 处理组 Ki67 阳性细胞率显著低于模型组 ($P < 0.001$), 表明 PD 在体内能够有效抑制肿瘤细胞的增殖活性。Western blotting 结果进一步揭示, 与模型组比较, PD 处理组肿瘤组织中 GPX4 和 FTH1 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.001$), 而 ACSL4 和 NCOA4 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.001$)。这些结果一致表明, PD 在体内同样通过调控铁死亡关键蛋白的表达, 诱导肿瘤组织发生铁死亡, 从而发挥抑制肿瘤生长的作用。

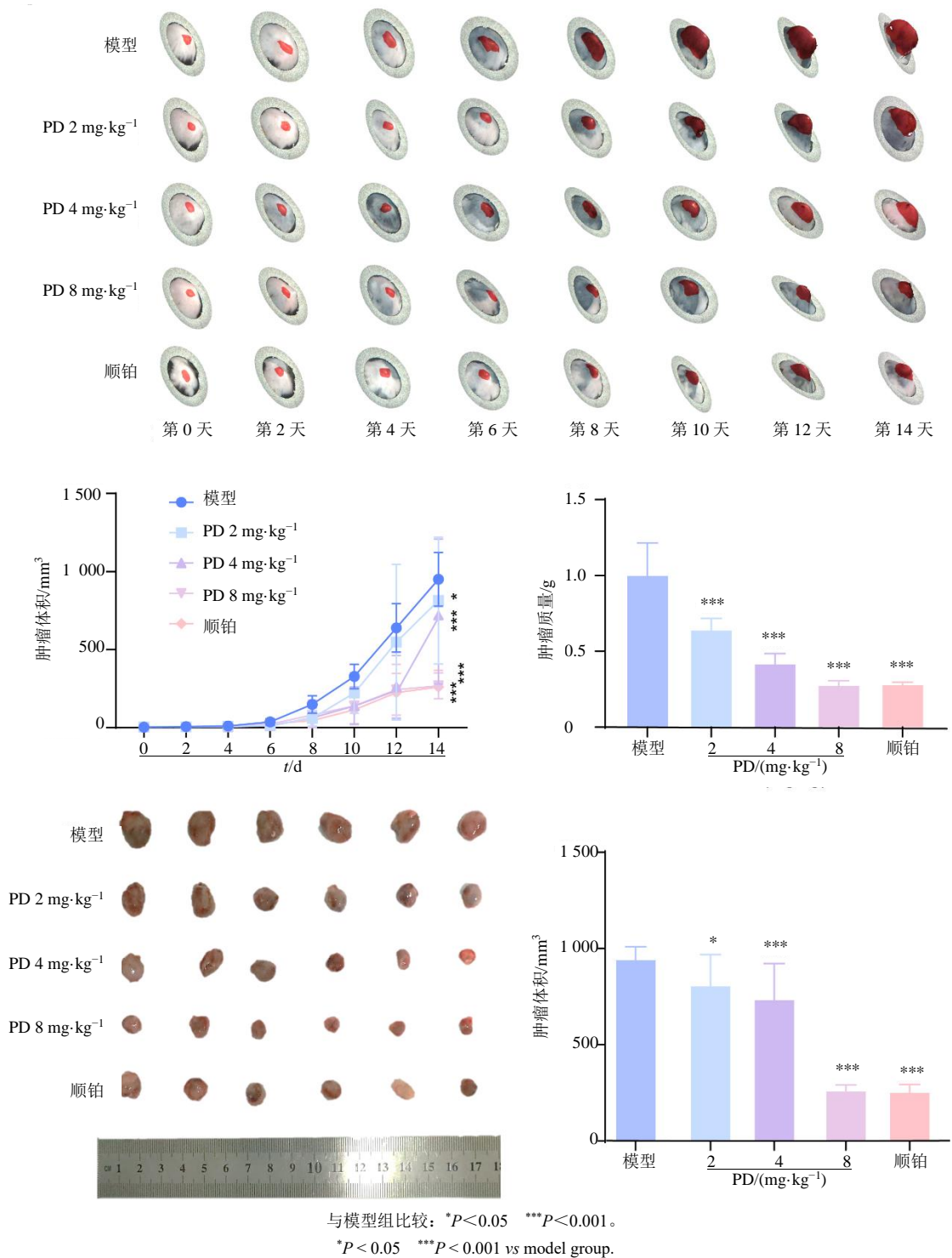


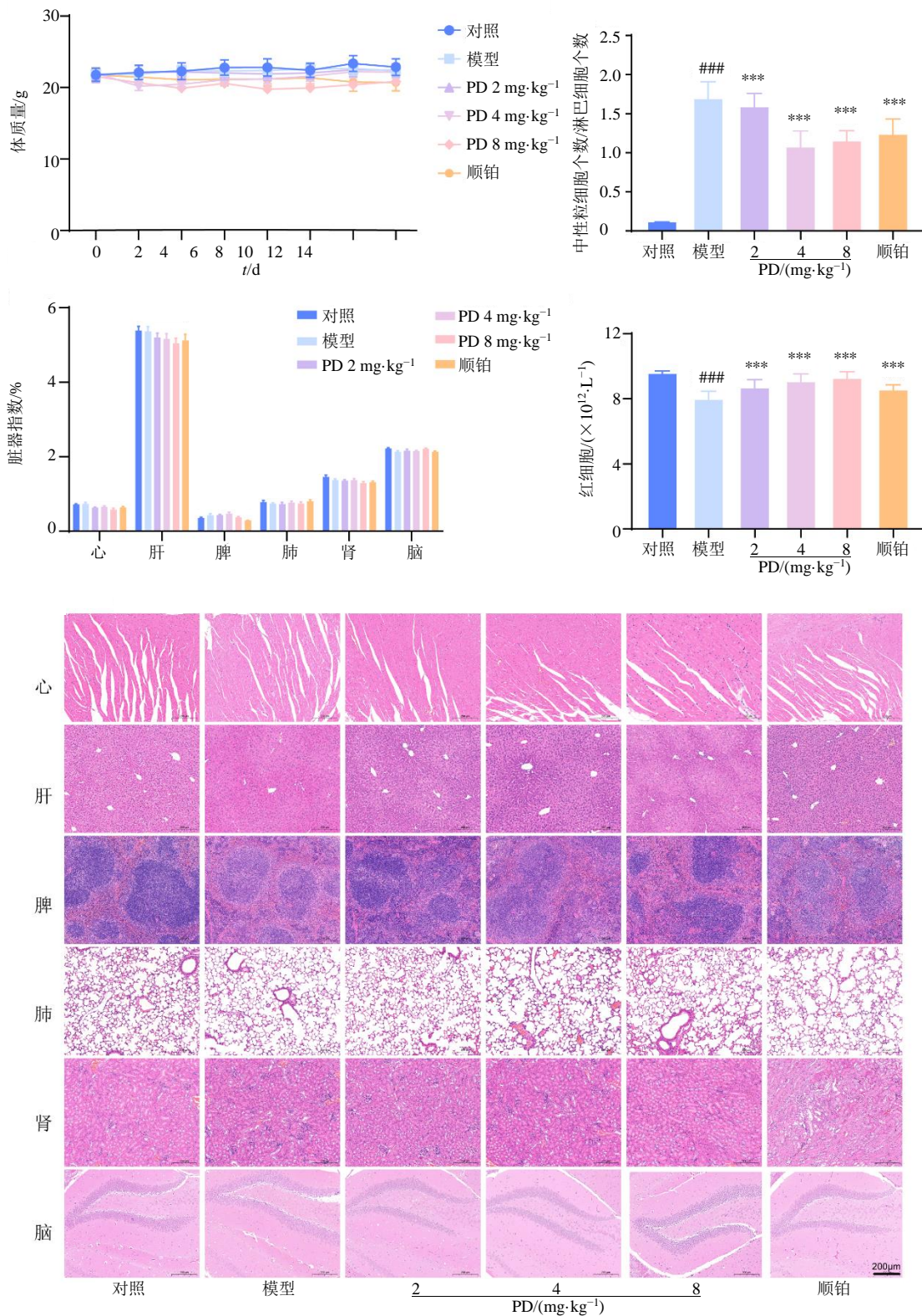
图 5 PD 抑制 LLC 荷瘤小鼠移植瘤的生长 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 PD inhibited growth of xenografted tumors in LLC-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

肺癌是全球癌症相关死亡的主要原因，其中 NSCLC 占比最高，患者常因耐药与治疗毒性面临生存挑战，因此，开发新型作用机制的抗肿瘤药物具有重要意义^[34]。铁死亡是一种以铁依赖的脂质过氧化物

异常累积为特征的新型细胞死亡方式，其核心在于抗氧化防御系统（尤其是 GPX4）的功能崩溃^[35]。研究证实，诱导铁死亡可有效抑制包括 NSCLC 在内的多种恶性肿瘤的生长，并为克服传统治疗耐药提供了新策略^[36]。中药活性成分因其多靶点、低毒性的



与对照组比较: ###*P*<0.001; 与模型组比较: ****P*<0.001.

###*P*<0.001 vs control group; ****P*<0.001 vs model group.

图 6 PD 作用于 LLC 荷瘤小鼠的安全性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Safety of PD acting on LLC tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

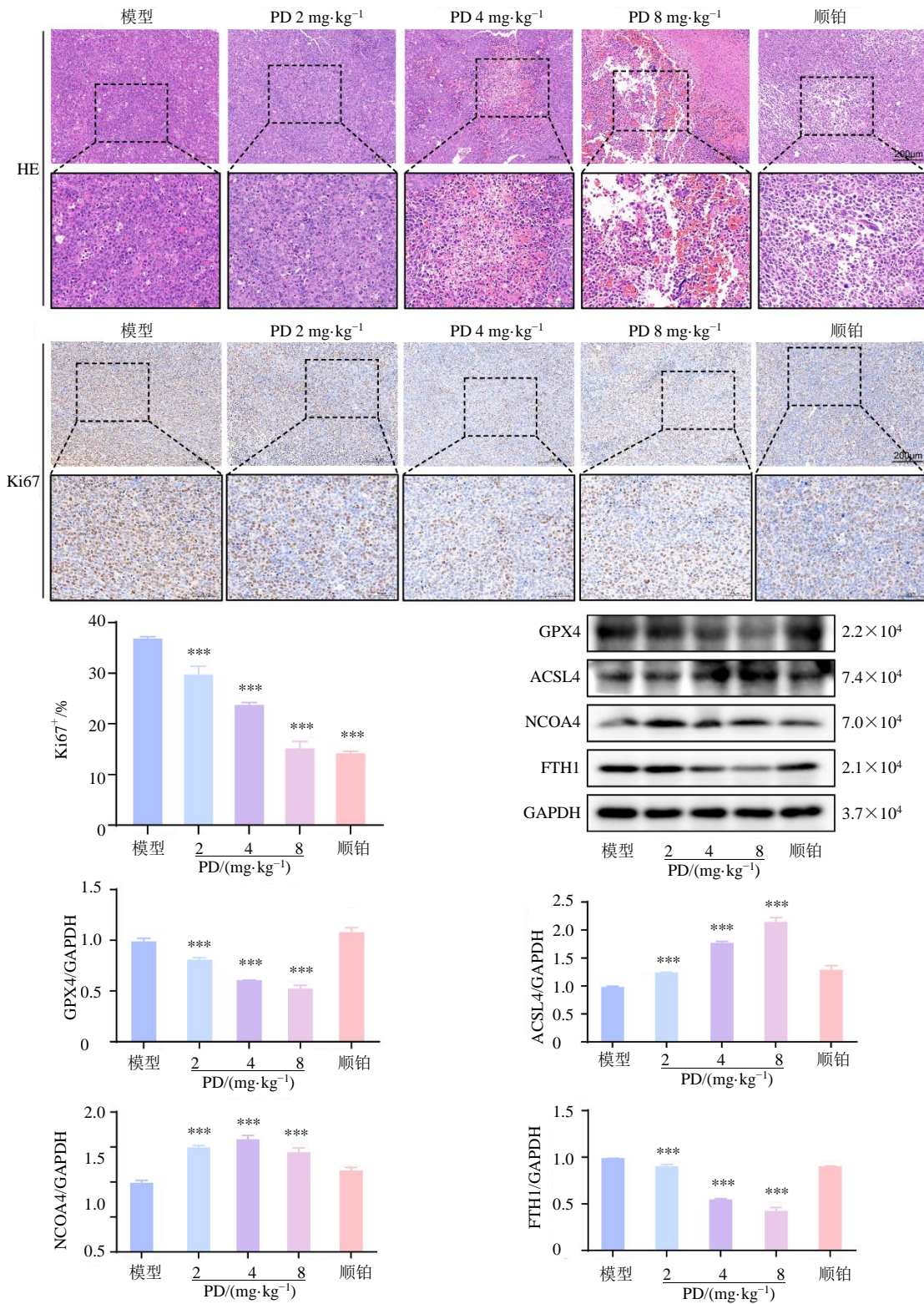


图 7 PD 抑制肿瘤组织增殖并诱导其发生铁死亡 ($\times 20$, $\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 PD inhibits proliferation of tumor tissues and induces ferroptosis ($\times 20$, $\bar{x} \pm s, n=6$)

特点, 在调控铁死亡方面展现出独特潜力。PD 是传统中药桔梗的主要活性成分, 前期研究揭示了其广

谱抗肿瘤活性^[37], 然而其是否通过诱导铁死亡抑制 NSCLC 尚未可知。

为阐明 PD 的体外抗肿瘤作用及其与铁死亡的关系,本研究首先在 A549 细胞模型中进行了验证。结果显示,PD 能浓度相关性地抑制细胞活力与克隆形成,并同时诱导细胞内 ROS 堆积、Fe²⁺水平升高、MDA 含量及脂质过氧化物增加。这些变化完整构成了铁死亡的典型生化特征谱^[38]。关键的是,铁死亡特异性抑制剂 Fer-1 和铁螯合剂 DFO 能显著逆转 PD 的细胞毒性,确证了 PD 的作用方式具有铁死亡特异性。GPX4 是防御脂质过氧化的核心酶,其下调直接削弱细胞的抗氧化能力^[39-40]; FTH1 下调与 NCOA4 上调则共同促进铁蛋白自噬,释放大量游离铁,通过芬顿反应催化脂质过氧化^[41];而 ACSL4 的上游进一步增加了细胞膜中易过氧化脂质的丰度^[42]。在分子机制层面,Western blotting 结果表明,PD 处理能协同下调关键抗氧化蛋白 GPX4 与铁储存蛋白 FTH1,同时上调脂质代谢酶 ACSL4 与铁蛋白自噬接头蛋白 NCOA4。PD 的这种多靶点干预模式,从“削弱防御”“增加铁源”和“提供底物”3 个关键环节系统性地破坏了肿瘤细胞的氧化还原稳态,最终驱动铁死亡的发生。

本研究进一步在 LLC 荷瘤小鼠模型中验证了 PD 的体内抗肿瘤活性及安全性。与体外结果一致,PD (2、4、8 mg·kg⁻¹) 能剂量相关性地显著抑制肿瘤生长,且各剂量组均未引起小鼠体质量下降、或主要脏器病理损伤,展现了良好的安全性。此外,HE 染色及 Ki67 染色检测结果共同表明,PD 能有效诱导肿瘤组织坏死并抑制其增殖。对肿瘤组织的深入分析显示,PD 在体内同样能够下调 GPX4 与 FTH1 蛋白表达,上调 ACSL4 与 NCOA4 蛋白表达,其趋势与体外实验结果一致。这些结果在整体动物水平证实,PD 诱导铁死亡是其发挥体内抗 NSCLC 作用的重要机制。

本研究首次揭示 PD 可通过多靶点调控铁死亡关键分子网络抑制非小细胞肺癌。其作用机制为:PD 同时下调 GPX4 和 FTH1 表达并上调 ACSL4 和 NCOA4 表达,协同削弱细胞抗氧化防御、扩大不稳定铁池并增加脂质过氧化敏感性,从而触发铁死亡。本研究不仅为阐明 PD 的抗肿瘤药理机制提供了全新视角,也为将桔梗及其中药复方开发成为基于铁死亡诱导策略的抗肿瘤药物奠定了重要的临床前实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gao C, Gao C Q, Yuan Q. A Meta-analysis of recombinant human endostatin combined with NP regimen for treating non-small cell lung cancer [J]. *Medicine*, 2024, 103(21): e38027.
- [2] Leiter A, Veluswamy R R, Wisnivesky J P. The global burden of lung cancer: Current status and future trends [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(9): 624-639.
- [3] Copeland J, Farooq T, Phillips S, et al. Sex differences persist across surgical treatments in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *JTCVS Open*, 2025, 25: 406-414.
- [4] 何权瀛. 《中华医学会肺癌临床诊疗指南(2025 版)》要点简介 [J]. *临床内科杂志*, 2025, 42(11): 900-901.
He Q Y. Brief introduction to the key points of clinical diagnosis and treatment guidelines for lung cancer of Chinese medical association (2025 edition) [J]. *J Clin Intern Med*, 2025, 42(11): 900-901.
- [5] 马吉利, 王佳艺, 乔慧. 非小细胞肺癌 EGFR 非经典突变靶向耐药后的治疗进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2025, 52(16): 854-859.
Ma J L, Wang J Y, Qiao H. Therapeutic advances for epidermal growth factor receptor non-classical mutations in non-small cell lung cancer after targeted therapy resistance [J]. *Chin J Clin Oncol*, 2025, 52(16): 854-859.
- [6] 程颖. 晚期非小细胞肺癌免疫治疗的研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48(8): 745-750.
Cheng Y. Research progress of immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2021, 48(8): 745-750.
- [7] Kumar M, Sarkar A. Current therapeutic strategies and challenges in nscLC treatment: A comprehensive review [J]. *Exp Oncol*, 2022, 44(1): 7-16.
- [8] 吉士俊, 刘楠. 线粒体能量代谢相关铁死亡在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2023, 30(5): 525-530.
Ji S J, Liu N. Recent progress of mitochondrial energy metabolism-related ferroptosis in tumor therapy [J]. *Chin J Pharm Biotechnol*, 2023, 30(5): 525-530.
- [9] 郭晓琦, 王天琪, 夏金婵, 等. 铁死亡在非小细胞肺癌中的作用及中药干预进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2024, 27(3): 216-230.
Guo X Q, Wang T Q, Xia J C, et al. Role of ferroptosis in non-small cell lung cancer and progress of traditional Chinese medicine intervention [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2024, 27(3): 216-230.
- [10] Berndt C, Alborzinia H, Amen V S, et al. Ferroptosis in health and disease [J]. *Redox Biol*, 2024, 75: 103211.
- [11] Wahida A, Conrad M. Decoding ferroptosis for cancer

- therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2025, 25(12): 910-924.
- [12] 刘梦丹, 莫海珍, 姚丽珊. 铁死亡及其潜在的靶向应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(9): 1268-1279.
- Liu M D, Mo H Z, Yao L S. Ferroptosis and its potential targeting applications [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2025, 41(9): 1268-1279.
- [13] Huang B, Wang H, Liu S, et al. Palmitoylation-dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis [J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 867.
- [14] 代国年, 孙凯瑞, 周雅馨, 等. 基于铁死亡的青蒿素衍生物多病靶向治疗研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(17): 6389-6403.
- Dai G N, Sun K R, Zhou Y X, et al. Ferroptosis-driven targeted therapy of artemisinin derivatives across multiple diseases [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(17): 6389-6403.
- [15] Zhang Y Y, Su F Z, Zhu E L, et al. A systematical review on traditional Chinese medicine treating chronic diseases via regulating ferroptosis from the perspective of experimental evidence and clinical application [J]. Chin Herb Med, 2025, 17(2): 246-260.
- [16] 江蒲, 张娜, 高坤, 等. 圣草次苷通过抑制 STAT3/GPX4 通路诱导食管癌 KYSE30 细胞铁死亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2025, 32(3): 281-287.
- Jiang P, Zhang N, Gao K, et al. Eriocitrin induces ferroptosis in esophageal cancer KYSE30 cells by inhibiting the STAT3/GPX4 pathway [J]. Chin J Cancer Biother, 2025, 32(3): 281-287.
- [17] 宋传芳, 艾江, 温超, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯提高肝癌细胞对仑伐替尼敏感性的机制 [J]. 中国药房, 2025, 36(18): 2256-2261.
- Song C F, Ai J, Wen C, et al. The mechanism of epigallocatechin gallate enhancing the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to lenvatinib [J]. China Pharm, 2025, 36(18): 2256-2261.
- [18] 龚政. 黄芩苷对高糖处理的小鼠成纤维细胞铁死亡的作用及机制 [D]. 扬州: 扬州大学, 2025.
- Gong Z. The effect and mechanism of baicalin on ferroptosis in mouse fibroblasts under high glucose treatment [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2025.
- [19] 马心怡, 许博文, 李杰, 等. 中医药防治恶性肿瘤的科学发展及发展方向 [J]. 中华肿瘤杂志, 2025, 47(2): 121-128.
- Ma X Y, Xu B W, Li J, et al. Direction and clinical practice of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cancer [J]. Chin J Oncol, 2025, 47(2): 121-128.
- [20] 方莎仪, 闵建新, 颜冬梅, 等. 常用中药中的萜类化合物治疗非小细胞肺癌作用及机制研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2025, 41(11): 121-128.
- Fang S Y, Min J X, Yan D M, et al. Research progress in effects and mechanisms of terpenoids in commonly used traditional Chinese medicines for treating non-small cell lung cancer [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2025, 41(11): 121-128.
- [21] 郭晓琦, 王天琪, 夏金婵, 等. 铁死亡在非小细胞肺癌中的作用及中药干预进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2024, 27(3): 216-230.
- Guo X Q, Wang T Q, Xia J C, et al. Role of ferroptosis in non-small cell lung cancer and progress of traditional Chinese medicine intervention [J]. Chin J Lung Cancer, 2024, 27(3): 216-230.
- [22] 翟民, 尹祎洁, 崔瑛, 等. 桔梗药味的文献研究 [J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(6): 2992-2996.
- Zhai M, Yin Y J, Cui Y, et al. Literature research on the flavor of *Platycodon grandiflorum* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2025, 40(6): 2992-2996.
- [23] 柴彦群, 毛迪, 柴艳平. 桔梗皂苷 D 防治肺部疾病的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(11): 2996-3000.
- Chai Y Q, Mao D, Chai Y P, et al. Research progress on pharmacological effects of platycoside D in preventing and treating lung diseases [J]. Drugs Clin, 2024, 39(11): 2996-3000.
- [24] Song Y, Lv X, Ding C B, et al. Research progress on the bioactivity of platycodin D from *Platycodon grandifloras* [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2025, 398(8): 9673-9701.
- [25] Feng M, Wang X J, Liu Y, et al. Transcriptomics reveals the mechanism of platycodin D targeting TGF β for anti-lung cancer activity [J]. Integr Cancer Ther, 2024, 23: 15347354241263041
- [26] Petiti J, Caria S, Revel L, et al. Standardized protocol for resazurin-based viability assays on A549 cell line for improving cytotoxicity data reliability [J]. Cells, 2024, 13(23): 1959.
- [27] 尹策, 刘畅, 冯革. KRT6A 介导 Wnt/ β -catenin 信号通路调节上皮-间质转化促进非小细胞肺癌 A549 细胞抗辐射 [J]. 中国医科大学学报, 2024, 53(7): 628-634.
- Yin C, Liu C, Feng G. KRT6A mediates the Wnt/ β -catenin signal pathway regulating EMT promoting radiation resistance in non-small cell lung cancer A549 cells [J]. J China Med Univ, 2024, 53(7): 628-634.
- [28] 高红芳, 周兰, 周己扬, 等. 基于 ATF2-Nrf2 通路探讨肺岩宁调控非小细胞肺癌铁死亡敏感性的作用机制

- [J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(4): 64-71.
- Gao H F, Zhou L, Zhou J Y, et al. Regulation of Feiyanning on sensitivity of non-small cell lung cancer to ferroptosis based on ATF2-Nrf2 pathway [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2025, 59(4): 64-71.
- [29] Zhou L, Li J B, Chen J, et al. Anticancer activity and mechanism studies of photoactivated iridium (iii) complexes toward lung cancer A549 cells [J]. Dalton Trans, 2024, 53(36): 15176-15189.
- [30] Bi R, Jiang L Y, Hu R, et al. Butyrate attenuates the stemness of lung cancer cells through lysosome Fe(2+)- and SLC7A11-mediated ferroptosis [J]. Heliyon, 2024, 10(7): e28093.
- [31] Kurien B T, Scofield R H. Western blotting [J]. Methods, 2006, 38(4): 283-293.
- [32] 程钊, 吴巍, 俞嘉鑫, 等. 一种新型中药配方通过触发磷酸戊糖途径依赖的氧化应激抑制非小细胞肺癌 [J]. 中国肺癌杂志, 2023, 26(9): 639-649.
- Cheng C, Wu W, Yu J X, et al. A novel Chinese medicine formula inhibits non-small cell lung cancer by triggering oxidative stress dependent on pentose phosphate pathway [J]. Chin J Lung Cancer, 2023, 26(9): 639-649.
- [33] 白越, 包诗田, 秦瑞, 等. 细胞核直径在鉴别诊断肺炎症性病变和肺腺癌中的研究 [J]. 临床个性化医学, 2025, 4(3): 642-650.
- Bai Y, Bao S T, Qin R, et al. The value of nuclear diameter in the differential diagnosis of pulmonary lesions and lung adenocarcinoma [J]. J Nanjing Norm Univ Nat Sci Ed, 2025, 48(2): 47-61.
- [34] 唐乾, 先正平, 唐钰, 等. 中药联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌的系统评价和中药有效成分筛选及其机制研究 [J]. 南京师大学报 (自然科学版), 2025, 48(2): 47-61.
- Tang Q, Xian Z P, Tang Y, et al. Systematic evaluation of traditional Chinese medicine combined with chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer and screening of effective components of traditional Chinese medicine and its mechanism [J]. J Nanjing Norm Univ Nat Sci Ed, 2025, 48(2): 47-61.
- [35] 杨欢, 鲁玉洁, 梁伟, 等. 基于 PI3K/Akt-GSK3 β 信号通路探讨安肠组方改善氧化应激与铁死亡治疗放射性肠炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志: 1-15. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20251801.
- Yang H, Lu Y J, Liang W, et al. Exploring mechanism of action of Anchang Group Prescription to ameliorate oxidative stress and iron death in treatment of radiation enteritis based on PI3K/Akt-GSK3 β signalling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form: 1-15. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20251801.
- [36] 张思棋, 常珂, 朱李飞, 等. 冬凌草甲素通过 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路介导的铁死亡抗肺癌活性及相关机制研究 [J]. 生命的化学, 2025, 45(8): 1696-1708.
- Zhang S Q, Chang K, Zhu L F, et al. Oridonin induced ferroptosis in treating lung cancer through Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. Chem Life, 2025, 45(8): 1696-1708.
- [37] 祝欣萍, 贾迪, 徐豪豪, 等. 桔梗皂苷 D 调控铁死亡抗骨肉瘤作用机制研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2025, 59(4): 364-371.
- Zhu X P, Jia D, Xu H H, et al. Study on the mechanism of platycodin D in regulating ferroptosis against osteosarcoma [J]. J Harbin Med Univ, 2025, 59(4): 364-371.
- [38] Lu Y N, Xie X T, Luo L X. Ferroptosis crosstalk in anti-tumor immunotherapy: Molecular mechanisms, tumor microenvironment, application prospects [J]. Apoptosis, 2024, 29(11/12): 1914-1943.
- [39] 杨晓妍, 周媛静, 罗秀菊, 等. 铁死亡途径及其相关分子泛素化修饰的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(2): 208-212.
- Yang X Y, Zhou Y J, Luo X J, et al. Research progress in ferroptosis pathways and ubiquitination modification of ferroptosis-related molecules [J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(2): 208-212.
- [40] Wei Z B, Hao C L, Radeen K R, et al. Deficiency in glutathione peroxidase 4 (GPX4) results in abnormal lens development and newborn cataract [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, 121(48): e2407842121.
- [41] 张了, 罗再, 黄陈. 脂质代谢介导的铁死亡在肿瘤进展中的作用及机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2025, 41(3): 353-363.
- Zhang L, Luo Z, Huang C. Role and mechanism of lipid metabolism-mediated ferroptosis in the progression of tumors [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2025, 41(3): 353-363.
- [42] 张展瑞, 刘红雨, 陈军. 线粒体在铁死亡中的作用及其与肿瘤的关系 [J]. 中国肺癌杂志, 2024, 27(10): 785-791.
- Zhang Z R, Liu H Y, Chen J. Role of mitochondria in ferroptosis and its relationship to tumors [J]. Chin J Lung Cancer, 2024, 27(10): 785-791.

[责任编辑 兰新新]