

17-羟-岩大戟内酯 B 经 System xc^- -GSH-GPX4 轴介导铁死亡与线粒体凋亡途径协同抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖

苏冰洁, 林 强, 葛佳润, 林 宇, 徐 磊, 卜 明*, 韩翠翠*

齐齐哈尔医学院 药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: 目的 基于蛋白组学方法探讨 17-羟-岩大戟内酯 B (HJB) 通过 System xc^- -谷胱甘肽 (GSH)-谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 轴诱导乳腺癌 MCF-7 细胞铁死亡与线粒体凋亡的双重作用及协同机制, 明确其抗乳腺癌的核心调控靶点。方法 采用 MTT 法检测 HJB (5、10、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响; 通过流式细胞术与激光共聚焦显微镜检测 HJB 对 MCF-7 细胞凋亡、线粒体膜电位 (JC-1)、活性氧 (ROS) 的影响; 采用串联质谱蛋白组学技术获取 HJB 作用 MCF-7 细胞的亚细胞定位和差异表达蛋白; 通过 eggNOG 和 KAAS 数据库进行基因本体 (GO) 以及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集; 通过 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络; 基于 DTNB 显色法与 GSH 还原酶循环法, 测定 GSH/GSH-氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量; 采用 RhoNox-6 与 CM-H₂DCFDA 探针检测亚铁离子 (Fe^{2+}) 与 ROS 水平; 显色法检测总铁离子与 Fe^{2+} 含量; WST-8 法检测 NAD⁺/还原型辅酶 I (NADH) 含量, 明确铁死亡相关表型; Western blotting 实验检测相关蛋白的表达; 分子对接技术验证 HJB 对相关核心靶点蛋白的结合能力。结果 MTT 结果显示, 与对照组比较, HJB 可呈浓度与时间相关性抑制 MCF-7 细胞增殖, 作用 24、48、72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 30.49、23.93、19.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; HJB 显著诱导细胞凋亡, 降低线粒体膜电位, 上调 MCF-7 细胞内 ROS 表达水平 ($P<0.01$ 、0.001)。铁死亡相关指标检测显示, HJB 组细胞内 GSH 含量降低、GSSG 水平升高, GSH/GSSG 比值下降; Fe^{2+} 特异性积累而总铁含量无明显变化, NAD⁺/NADH 比值降低, 细胞氧化还原稳态遭到破坏 ($P<0.05$ 、0.01、0.001); Western blotting 证实 HJB 可下调溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (GCLC)、GR、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白表达, 显著抑制 System xc^- -GSH-GPX4 轴功能 ($P<0.01$ 、0.001); 同时, HJB 上调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体、细胞色素 C (Cyt C)、cleaved Caspase-7 蛋白表达, 下调 Bcl-2 蛋白表达, 激活线粒体凋亡通路 ($P<0.01$ 、0.001)。蛋白组学分析共鉴定出 2 136 个差异表达蛋白, 主要富集于 GSH 代谢与肿瘤相关通路, 线粒体定位蛋白差异显著, 与双通路调控的实验结果相互印证。分子对接结果显示, HJB 可与 GSH、GSSG、GPX4 蛋白稳定结合。结论 HJB 可通过抑制 System xc^- -GSH-GPX4 轴触发细胞铁死亡, 同时激活线粒体凋亡通路, 双重途径协同杀伤乳腺癌 MCF-7 细胞。

关键词: 17-羟-岩大戟内酯 B; 乳腺癌; 蛋白组学; 铁死亡; 凋亡

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)08-2675-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.005

17-Hydroxyjolkinalide B synergistically inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells by mediating ferroptosis and mitochondrial apoptosis pathways via the System xc^- -GSH-GPX4 axis

SU Bingjie, LIN Qiang, GE Jiarun, LIN Yu, XU Lei, BU Ming, HAN Cuicui

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

Abstract: Objective To investigate the dual effects and synergistic mechanism of 17-hydroxy jolkinalide B (HJB) on inducing ferroptosis and mitochondrial apoptosis in breast cancer MCF-7 cells via the System xc^- -GSH-GPX4 axis based on proteomic approaches, and to identify its core regulatory targets against breast cancer. **Methods** The effect of HJB (5, 10, 20, 40, and

收稿日期: 2026-05-20

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2024H077); 黑龙江省博士后科研启动基金项目 (LBH-QY22003); 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目 (2023-KYYWF-0861); 齐齐哈尔医学院重点学科建设资助项目 (QYZDXK-008)

作者简介: 苏冰洁, 研究方向为药理学。E-mail: 13723062164@163.com

*通信作者: 卜 明, 研究方向为药理学。E-mail: buming@qmu.edu.cn

韩翠翠, 研究方向为药理学。E-mail: hancuicui-1234@163.com

80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the viability of breast cancer MCF-7 cells was detected by MTT assay. Flow cytometry and laser confocal microscopy were applied to measure cell apoptosis, mitochondrial membrane potential (JC-1) and reactive oxygen species (ROS) levels. Tandem mass spectrometry-based proteomics was performed to analyze the subcellular localization and differentially expressed proteins (DEPs) in MCF-7 cells upon HJB treatment. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted using the eggNOG and KAAS databases, and a protein-protein interaction (PPI) network was constructed via the STRING database. The contents of glutathione (GSH/GSSG) were determined by DTNB colorimetric assay and glutathione reductase cycling assay. The levels of intracellular ferrous iron (Fe^{2+}) and ROS were detected using RhoNox-6 and CM-H2DCFDA fluorescent probes, respectively. Total iron and ferrous iron contents were measured by colorimetric assay, and the NAD^+/NADH ratio was detected by WST-8 assay to clarify ferroptosis-related phenotypes. The expression levels of target proteins were detected by Western blotting. Molecular docking was performed to verify the binding affinity of HJB to core target proteins. **Results** MTT results showed that HJB significantly inhibited MCF-7 cell proliferation in a concentration- and time-dependent manner compared to the control group, with half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of 30.49, 23.93, and 19.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at 24, 48, and 72 h, respectively. HJB markedly induced apoptosis, reduced mitochondrial membrane potential, and upregulated intracellular ROS levels in MCF-7 cells ($P < 0.01, 0.001$). Analysis of ferroptosis-related indicators revealed that HJB decreased intracellular GSH content while increasing GSSG levels, leading to a reduced GSH/GSSG ratio; Fe^{2+} accumulated specifically without significant changes in total iron content, and the NAD^+/NADH ratio decreased, indicating disruption of cellular redox homeostasis ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Western blotting confirmed that HJB downregulated the expression of SLC7A11, GCLC, GR, and GPX4 proteins, significantly suppressing the function of the System xc^- -GSH-GPX4 axis ($P < 0.01, 0.001$). Meanwhile, HJB upregulated the expression of Bax, cytochrome c (Cyt C), and cleaved Caspase-7 proteins, while downregulating Bcl-2 protein expression, thereby activating the mitochondrial apoptotic pathway ($P < 0.01, 0.001$). Proteomic analysis identified 2 136 differentially expressed proteins, primarily enriched in GSH metabolism and tumor-related pathways, with significant differences observed in mitochondrion-localized proteins, consistent with the dual-pathway regulation demonstrated experimentally. Molecular docking results indicated that HJB could stably bind to GSH, GSSG, and GPX4 proteins. **Conclusion** HJB triggers cellular ferroptosis by inhibiting the System xc^- -GSH-GPX4 axis and concurrently activates the mitochondrial apoptosis pathway. The two pathways exert synergistic cytotoxic effects on breast cancer MCF-7 cells.

Key words: 17-hydroxy jolkinolide B; breast cancer; proteomics; ferroptosis; apoptosis

乳腺癌是全球女性中最常见的恶性肿瘤^[1]。近年来, 尽管放化疗在乳腺癌治疗中成效显著, 但多数药物仍存在不良反应强、易耐药的问题^[2]。因此, 研发高效低毒的天然药物已成为乳腺癌研究的热点方向^[3]。

天然产物是抗癌药物的重要来源, 约 80% 的抗癌药源于此。狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Auct. non Steud. 因其独特的生物活性成分和潜在的医疗价值, 是极具潜力的天然抗癌药物资源。研究表明, 二萜类化合物是狼毒大戟的核心抗癌活性成分, 目前已从该植物中分离鉴定出 24 种具有明确抗癌活性的二萜类物质, 17-羟-岩大戟内酯 B (HJB) 是狼毒大戟中代表性的松香烷二萜类化合物^[4-6]。文献报道 HJB 可直接作用于致癌基因 Janus 激酶 (JAK) 家族, 从而使肿瘤细胞凋亡发挥其抗肿瘤作用^[7]。同时有研究表明, HJB 对人肝癌 HepG2 细胞、人白血病 K562 细胞、黑色素瘤 B16 细胞均有抑制作用^[8-10]。但 HJB 对乳腺癌的影响及其潜在机制尚未完全阐明。基于 TMT 蛋白质组学的系统性研究

策略, 能够全面揭示药物作用机制与疾病发生发展的内在联系, 是深入阐明 HJB 调控乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为的理想研究方法。

铁死亡是一种铁离子依赖性的调节性细胞死亡模式, 它的核心特征是细胞内脂质过氧化物积累和氧化还原的失衡, 其发生不依赖半胱氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 激活, 与细胞凋亡的调控机制存在本质差异, 可有效杀伤凋亡耐药的肿瘤细胞, 已成为抗肿瘤领域的新兴研究靶点^[11]。谷胱甘肽 (GSH) 作为谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的必需还原型辅酶, 与 GPX4 共同构成铁死亡核心抑制轴, 可催化清除细胞膜脂质过氧化物^[12-13]。已有研究证实, GSH 代谢失衡也是诱发细胞凋亡的重要诱因之一^[14]。System xc^- (关键亚基 SLC7A11) 介导的胱氨酸摄取是 GSH 合成的关键步骤, GSH/氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 是细胞还原能力的重要指标^[15]。当 System xc^- 功能异常或氧化应激导致 GSH 耗竭时, GPX4 不可逆失活, 脂质过氧化物大量累积, 最终会诱发铁死亡^[16-17]。铁死亡作为铁依赖性、脂质过氧化驱

动的新型程序性细胞死亡,可特异性杀伤耐药、间质表型及癌症干细胞样肿瘤细胞,能与化疗、靶向、免疫等疗法协同增效,是攻克肿瘤耐药、拓展抗癌策略并推动临床治疗创新的关键方向^[18]。从抗肿瘤策略的创新性来看,“凋亡+铁死亡”双重通路调控相较于单一凋亡诱导具有显著优势。单一靶向凋亡的治疗方案易因肿瘤细胞 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 家族蛋白异常表达、Caspase 通路突变等产生耐药,临床应用受限,而铁死亡与凋亡的调控通路相对独立,二者联合可通过不同机制协同杀伤肿瘤细胞,降低耐药发生风险。同时,氧化应激与线粒体功能损伤是两条通路的共同调控节点,铁死亡伴随的脂质过氧化与氧化损伤可进一步放大线粒体凋亡信号,实现协同增效的抗肿瘤作用,降低药物用量与不良反应风险。目前尚未有研究报道 HJB 可诱导乳腺癌细胞铁死亡,其通过双重通路协同发挥抗乳腺癌作用仍不明确,是本研究的核心切入点与创新之处。

本研究利用蛋白组学方法,通过体外细胞实验与分子机制验证,系统探究 HJB 对乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制作用及调控机制,重点阐明通过 System xc⁻-GSH-GPX4 轴诱导铁死亡、并协同线粒体凋亡的双重抗肿瘤效应,为 HJB 作为抗乳腺癌天然活性成分的研究与开发提供实验依据,也为乳腺癌多通路联合治疗策略提供新的研究思路。

1 材料

1.1 细胞

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞(批号 TCHC247)购自泉州海星生物科技有限公司。

1.2 药品及主要试剂

17-羟-岩大戟内酯 B (批号 251120, 质量分数 ≥98%) 购自南京道斯夫生物科技有限公司; DMEM (批号 A4192101) 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清(批号 D6429)、MTT 试剂盒(批号 11465007001) 均购自 Merck Millipore 公司; 活性氧(ROS)检测试剂盒(批号 CA1420)、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(批号 CA1020)、JC-1 试剂盒(批号 M8650) 均购自北京索莱宝科技有限公司; Omni-Rapid™ 快速蛋白定量试剂盒(批号 ZJ103)、RIPA 裂解液(批号 PC101)、山羊抗兔 IgG 二抗(批号 LF102) 均购自上海雅酶生物医药科技有限公司; Bcl-2 抗体(批号 UPAA778Mu01) 购自武汉云克隆科技股份有限公司; Bcl-2 相关 X

蛋白(Bax)抗体(批号 UMAB343Hu22)、细胞色素 C (CytC) 抗体(批号 PAA594Hu01)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号 CAB932Hu22) 均购自武汉云克隆科技股份有限公司; Caspase-7 多克隆抗体(批号 12827S)、活化的 Caspase-7 (cleaved Caspase-7) 抗体(批号 9491S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 铁离子与亚铁离子检测试剂盒(亚铁嗉法)(批号 BB-47424)、GSH/GSSG 检测试剂盒(批号 BB-4103)、吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)双染试剂盒(批号 BB-4132) 均购自上海贝博生物科技有限公司; NAD⁺/还原型辅酶 I (NADH) 检测试剂盒(WST-8 法)(批号 S0175)、铁死亡荧光检测试剂盒(RhoNox-6/CM-H2DCFDA)(批号 C1190S) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.3 实验仪器

Heracell™ VIOS 160i CR CO₂ 培养箱、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 细胞培养及 MTT 法检测细胞活力

采用含 10%胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养液,于 37 °C、5%CO₂ 环境常规培养 MCF-7 细胞。选取对数生长期细胞,以每孔 3×10³ 个接种至 96 孔板,细胞贴壁后移除原有培养液。实验设置对照组与不同浓度 HJB (5、10、20、40、80 μmol·L⁻¹) 组, HJB 组各孔分别加入 150 μL 对应含药培养基,对照组加入等量常规培养基。分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液避光孵育 4 h,吸弃上清液,加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO)充分振荡溶解甲瓚结晶。于 490 nm 测吸光度(A)值,计算抑制率,用 SPSS 27.0 拟合半数抑制浓度(IC₅₀)。

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

2.2 细胞凋亡检测

2.2.1 流式细胞术 取对数生长期 MCF-7 细胞,经消化计数后,以每孔 1×10⁶ 个接种于 6 孔板,37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 完成贴壁培养。实验设置对照组与 HJB 低、中、高浓度(10、20、40 μmol·L⁻¹) 组,

药物作用 48 h 后弃去培养液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗细胞, 采用无 EDTA 胰酶消化收集细胞并置于 EP 管内, $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, PBS 反复洗涤 2 次。依次添加结合缓冲液、Annexin V-FITC 与 PI 染液, 室温避光染色 20 min, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平, 采用 FlowJo 10.8.1 软件完成数据分析。另取对数生长期细胞, 消化计数后以每孔 1×10^5 个铺于含无菌爬片的 12 孔板, 同条件孵育 24 h 至贴壁。

2.2.2 流式细胞术 设对照组与 HJB 低、中、高浓度 (10 、 20 、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 药物作用 48 h 后弃上清, PBS 洗 2 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 再洗 2 次。按 AO/EB 试剂盒说明加入染色工作液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min, 取出爬片用含抗荧光淬灭封片液的载玻片封片, 激光共聚焦显微镜成像, ZEN 软件完成图像处理与定量分析。

2.3 细胞线粒体膜电位检测

细胞接种及给药操作参照“2.2.1”项方法进行, 药物干预 48 h 后, 弃去孔内含药培养液, 采用 PBS 对细胞进行 1 次冲洗, 随后使用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 将消化后的细胞收集至 1.5 mL EP 管中。将 EP 管置于离心机中, 以 $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 3 min, 弃去上清液后, 用 PBS 缓冲液对细胞沉淀洗涤 2 次。向每支 EP 管中加入适量 JC-1 工作液, 将其放入培养箱内, 在避光条件下孵育 20 min, 孵育结束后弃去上清液, 用无血清培养基洗涤细胞 2 次, 再加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 无血清培养基重悬细胞沉淀。采用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的变化情况, 检测所得数据采用 FlowJo 10.8.1 软件进行统计分析。

细胞爬片的制备及给药方法同“2.2.2”项, 药物作用 48 h 后, JC-1 染色操作严格遵循对应试剂盒说明书要求进行, 染色完成后, 通过激光扫描共聚焦显微镜采集细胞荧光图像, 图像的处理及定量分析借助 ZEN 软件完成。

2.4 ROS 测定

参照“2.2.1”项下方法完成 MCF-7 细胞培养、铺板与给药, 药物作用 48 h 后吸弃培养液, PBS 漂洗细胞, 采用无 EDTA 胰酶消化收集细胞并置于离心管内, $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, PBS 洗涤 2 次。加入 DCFH-DA 工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 去除上清后用无血清培养液清洗, 重悬细胞后利用流式细胞仪检测细胞内 ROS 含量, 采用 FlowJo 10.8.1

软件处理数据。

细胞爬片的制备及给药方法同“2.2.2”项, 药物作用 48 h 后, 严格按照试剂盒说明进行 DCFH-DA 荧光染色, 借助激光共聚焦显微镜拍摄荧光图像, 通过 ZEN 软件完成图像观测与数据分析。

2.5 TMT 蛋白组学及生物信息学探究 HJB 的作用机制

2.5.1 细胞处理 取对数生长期 MCF-7 细胞铺于培养皿, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 至贴壁后分组。设对照组、HJB ($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 每组 3 个复孔, 给药 48 h 后以无 EDTA 胰酶消化收集细胞, $2\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min 取沉淀备用。

2.5.2 蛋白提取 样品中滴加 TCA 至终浓度 20%, 涡旋混匀后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\,500\times g$ 离心 5 min 收集沉淀。沉淀以预冷丙酮洗涤 3 次, 室温晾干 1 min, $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TEAB 溶解并超声分散。依次加入 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 还原 30 min、 $11\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 室温避光烷基化 15 min, 按酶与蛋白质量比 1:50 加入测序级胰蛋白酶, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶解过夜。酶解产物经 Strata X 柱脱盐纯化, 样品前处理及检测均由杭州景杰生物完成。

2.5.3 液相色谱-质谱联用分析 将胰酶酶解后的肽段溶于流动相 A, 上样至自制反相分析柱 ($25\text{ cm}\times 100\text{ }\mu\text{m}$)。以 2% 乙腈 (含 0.1% 甲酸) 为流动相 A、乙腈 (含 0.1% 甲酸) 为流动相 B 进行梯度洗脱 ($0\sim 14\text{ min}$, $6\%\rightarrow 24\%\text{ B}$; $14\sim 16\text{ min}$, $24\%\rightarrow 35\%\text{ B}$; $16\sim 18\text{ min}$, $35\%\rightarrow 80\%\text{ B}$; $18\sim 20\text{ min}$, $80\%\text{ B}$) , 体积流量 $500\text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。肽段经毛细管电喷雾进入 timsTOF Pro 质谱仪, 电喷雾电 1.75 kV 。质谱采用 DIA-PASEF 模式采集数据, 一级扫描 $m/z\ 300\sim 1\,500$, 每个循环执行 20 次 PASEF-MS/MS 扫描, 二级扫描 $m/z\ 400\sim 850$, 隔离窗口为 $m/z\ 7$ 。

2.5.4 数据库检索 利用 DIA-NN 1.8 软件对原始 DIA 质谱数据开展检索分析, 数据库选用 UniProt Swiss-Prot 人源蛋白序列库, 并搭配反向诱饵库联合比对。酶解方式设定为胰酶酶切, 允许 1 个酶切漏位点; 固定修饰设定为甲硫氨酸切除与半胱氨酸氨甲酰甲基化修饰, 严格将肽段及蛋白水平的假阳性率控制在 1% 以内。

2.5.5 基因本体 (GO) 借助 EggNOG-mapper 工具依托 EggNOG 数据库完成蛋白序列 GO 功能注释, 上传 FASTA 格式序列获取对应 GO 功能条目并完成功能分类。以全基因组数据作为参照背景, 采用

超几何分布检验开展 GO 功能富集分析。

2.5.6 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路 将 FASTA 格式蛋白序列与 KEGG 数据库序列开展 BLAST 同源比对, 设定 E 值阈值为 1×10^{-4} , 依据最优比对匹配结果完成蛋白 KEGG 通路功能注释。

2.5.7 亚细胞定位 借助 WoLF PSORT 工具预测 MCF-7 细胞蛋白的亚细胞定位。将蛋白氨基酸序列整理为 FASTA 格式后导入软件, 依据信号肽及跨膜区等特征, 将蛋白归类至胞外、胞质、细胞核等 12 种亚细胞区室。

2.5.8 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络 运用 STRING 数据库检索差异蛋白信息, 以置信度得分 > 0.7 为筛选标准获取高可信度 PPI 关系, 构建 PPI 网络, 再通过 R 语言 visNetwork 程序包实现网络可视化绘制。

2.6 GSH/GSSG 含量检测

参照“2.2.1”项下方法完成 MCF-7 细胞培养、铺板与给药, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 条件下继续孵育 24 h, 弃培养液后以预冷 PBS 洗 2 遍。每孔添加 $300\text{ }\mu\text{L}$ 蛋白去除试剂 M, 冰上裂解 5 min, 收集裂解液至 1.5 mL EP 管, 经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000 \times g$ 离心 10 min 后取上清, 用于 GSH 与 GSSG 定量检测。操作严格遵循 GSH/GSSG 试剂盒说明, 以酶标仪于 412 nm 波长处测定对照品及样品 A 值。

2.7 细胞中亚铁离子 (Fe^{2+}) 和 ROS 的检测

细胞爬片的制备及给药方法同“2.2.2”项, 药物作用 48 h 后, 用 RhoNox-6 游离 Fe^{2+} 特异性荧光探针与 CM-H2DCFDA 总 ROS 探针双染法染色, 采用激光共聚焦显微镜进行拍照, 使用 ZEN 软件对图像进行处理与分析。

2.8 细胞中总铁离子与 Fe^{2+} 含量的检测

细胞接种及给药操作参照“2.2.1”项方法进行, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中继续培养 48 h 后, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 试剂盒配套的铁检测裂解液, 冰上充分裂解细胞 10 min。将细胞裂解液转移至 1.5 mL 离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液用于铁含量测定。用总铁离子与亚铁离子检测试剂盒进行检测, 严格按照试剂盒说明书操作。用酶标仪在 593 nm 处测定对照品与样品的 A 值。

2.9 细胞中 NAD^+/NADH 含量的检测

细胞接种及给药操作参照“2.2.1”项方法进行, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中继续培养 48 h 后, 弃去

培养基, 每孔加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 冰浴预冷的 NAD^+/NADH 提取液, 随后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000 \times g$ 离心 $5\sim 10\text{ min}$, 取上清为待测样品备用。用 NAD^+/NADH 检测试剂盒进行检测, 严格按照试剂盒说明书操作。用酶标仪在 450 nm 测定对照品与样品的 A 值。

2.10 Western blotting 检测蛋白表达水平

细胞接种及给药操作参照“2.2.1”项方法进行, 药物作用 48 h 后, 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度并进行蛋白变性。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳分离后转印至 PVDF 膜, 使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h; 加入稀释比例 $1:1\text{ }000$ 的一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。TBST 充分洗涤后, 加入 $1:2\text{ }000$ 比例稀释的二抗室温孵育 1.5 h, 滴加 ECL 化学发光试剂显影, 借助凝胶成像系统采集蛋白条带, 最后运用 Image J 软件完成条带灰度值定量分析。

2.11 分子对接

从 PubChem 数据库检索获取 HJB 分子三维结构, 借助 AutoDockTools 完成小分子结构预处理。于 PDB 数据库下载靶点蛋白晶体结构, 通过 PyMOL 去除原配体与水分子, 再导入 AutoDockTools 完成加氢及电荷参数计算。完成分子对接后, 采用 PyMOL 可视化分析小分子与靶点蛋白的结合作用模式。

2.12 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件处理实验数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较经单因素方差分析, 差异显著时进一步以 LSD-*t* 法两两比较。

3 结果

3.1 HJB 对 MCF-7 细胞增殖的影响

MTT 结果如图 1 所示, 与对照组比较, HJB 处理 MCF-7 细胞 24、48、72 h 后均显著抑制增殖 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈浓度及时间相关性。24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 30.49 、 23.93 、 $19.30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 据此确定后续给药浓度。

3.2 HJB 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞术与激光共聚焦检测结果见图 2, 10 、 20 、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HJB 作用 MCF-7 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率依次为 $(13.88 \pm 1.28)\%$ 、 $(25.35 \pm 2.46)\%$ 、 $(35.70 \pm 3.56)\%$, 相较对照组均显著升高, 差异具有极显著统计学意义 ($P < 0.01$ 、 0.001)。AO/EB 双染观察到随 HJB 浓度增加, 绿色活细胞逐渐减少, 红色凋亡细胞显著增多, 与流式结果一致。结果

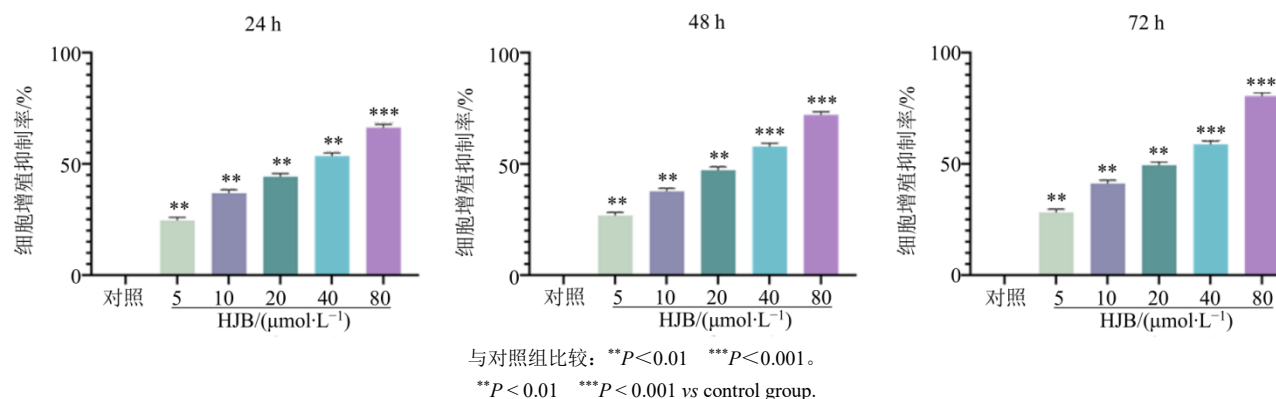


图 1 HJB 对 MCF-7 细胞增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

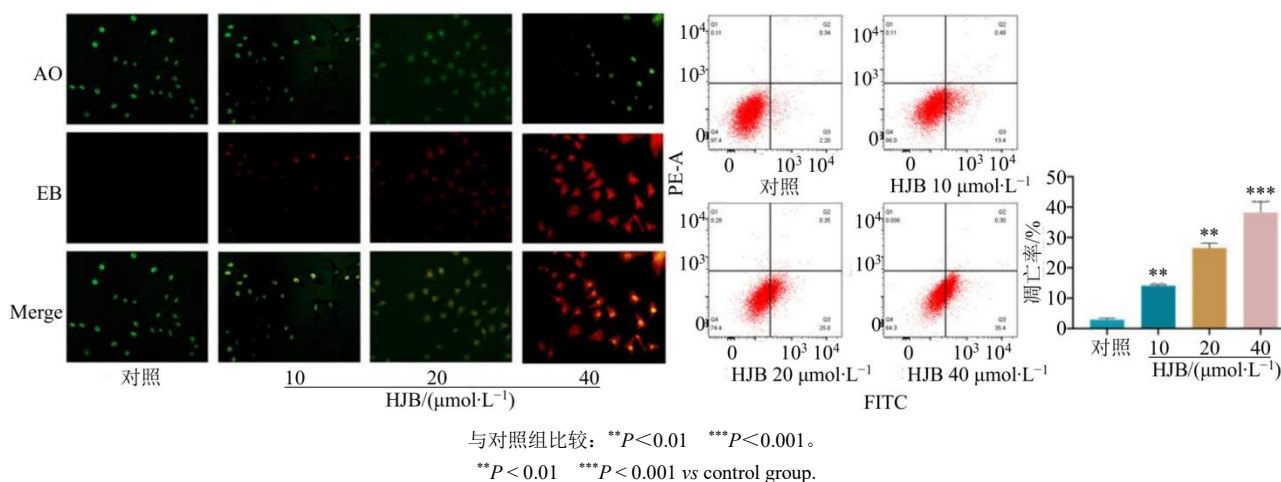


图 2 HJB 对 MCF-7 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

表明, HJB 能诱导 MCF-7 细胞凋亡且呈浓度相关性。

3.3 HJB 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响

流式及共聚焦检测结果如图 3 所示, 经不同浓

度 HJB 处理后, JC-1 单体比例较对照组显著升高 ($P < 0.01, 0.001$), 共聚焦图像亦显示绿色荧光随给药浓度增加而明显增强。结果提示, HJB 可损伤线粒体功能, 干扰细胞能量代谢及生理活性。

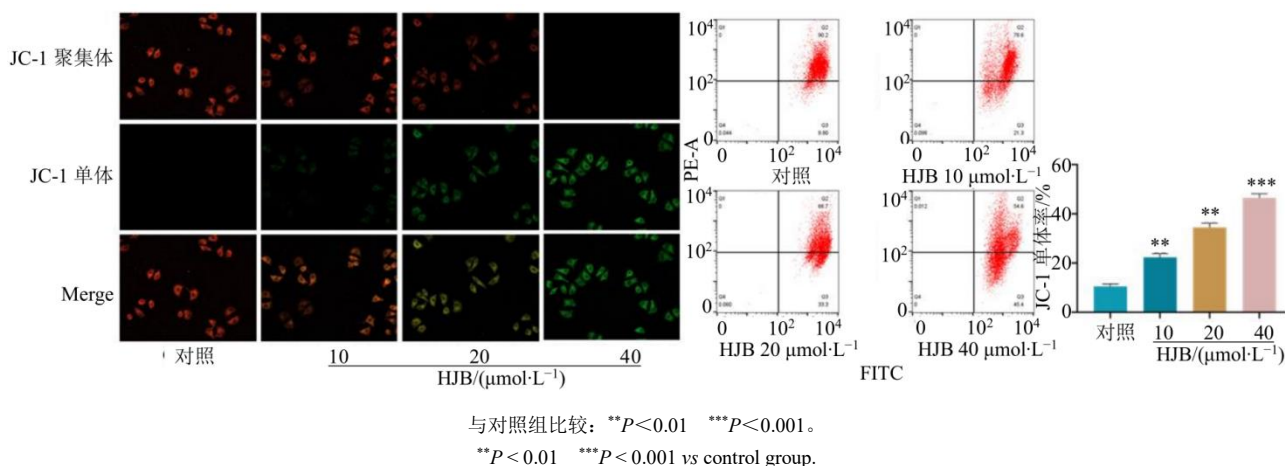


图 3 HJB 对 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of HJB on mitochondrial membrane potential of MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 HJB 对 MCF-7 细胞 ROS 水平的影响

流式细胞术检测结果及共聚焦结果见图 4, 相较于对照组, HJB 各浓度组细胞荧光强度均

明显上调。结果表明, HJB 能够上调 MCF-7 细胞内 ROS 表达水平, 且该作用呈现明显浓度相关性。

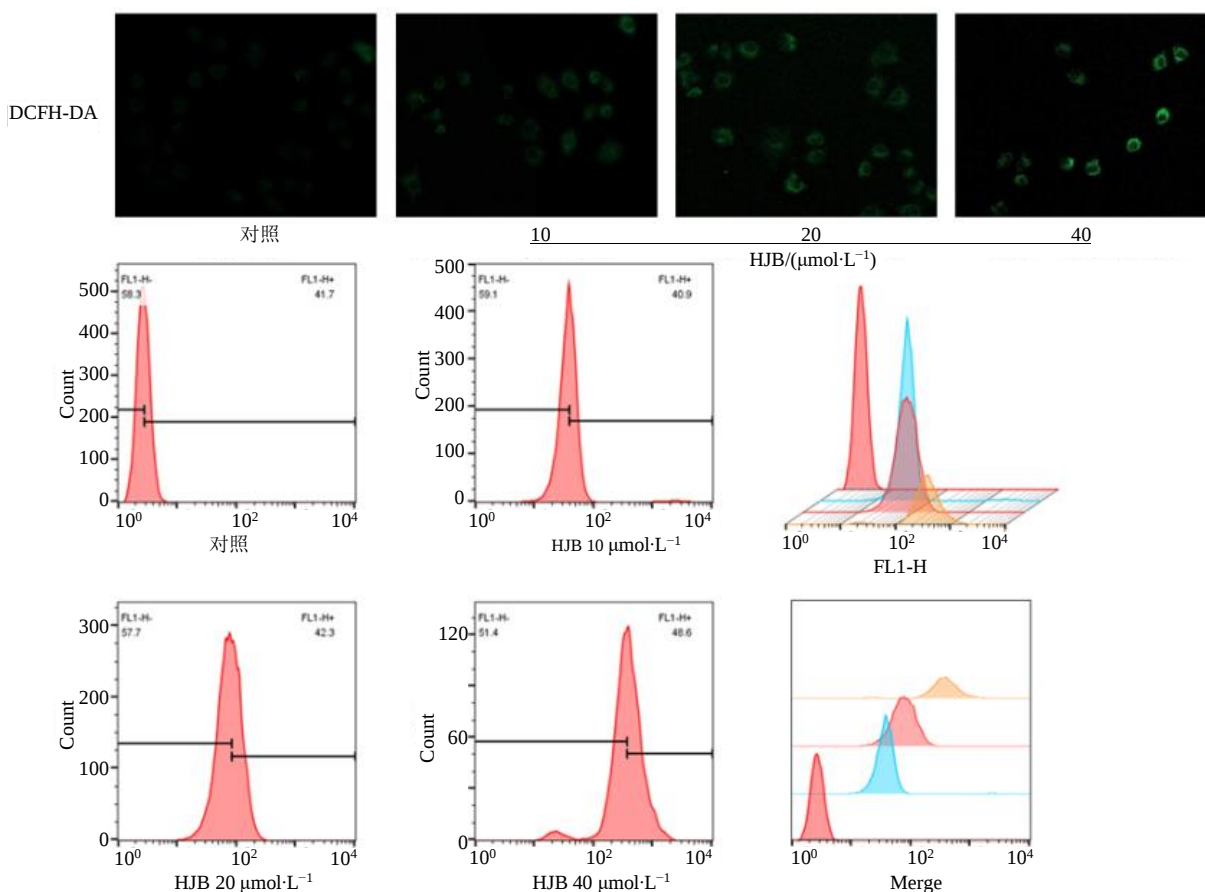


图 4 HJB 对 MCF-7 细胞 ROS 水平的影响

Fig. 4 Effect of HJB on ROS levels in MCF-7 cells

3.5 差异表达蛋白分析

基于 TMT 标记定量蛋白质组学分析, 以 $P < 0.05$ 为筛选标准并联合差异倍数 (FC) 评估, 设定 $FC \geq 1.53$ 为蛋白显著上调阈值, $FC \leq 1/1.5$ 为显著下调阈值。如图 5-A 所示, HJB 组相较对照组共筛选出 2 136 个差异蛋白, 包括 712 个上调及 1 424 个下调蛋白。图 5-B 为经 t 检验后绘制的火山图, 直观呈现差异蛋白分布特征。为进一步揭示各组间差异蛋白的表达模式与聚类关系, 构建全部比较组差异蛋白并集的表达热图 (图 5-C), 结果显示 HJB 组与对照组间蛋白表达存在明显差异。

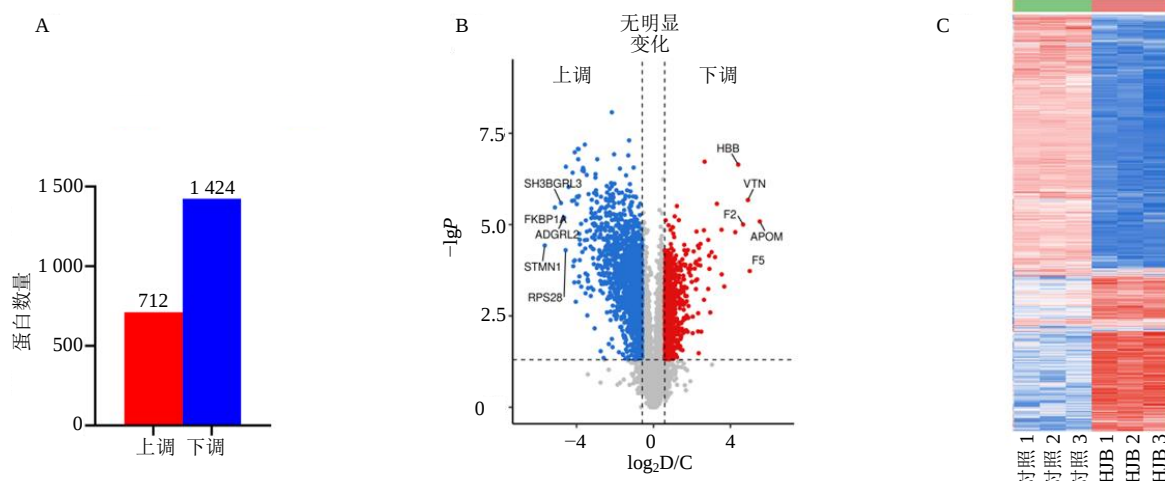
3.6 亚细胞定位分析

亚细胞定位分析显示, 对照组与 HJB 组间差异蛋白主要富集于细胞质 (709 个, 33.19%)、细胞核 (708 个, 33.15%)、细胞外区域 (210 个, 9.83%)、

线粒体 (199 个, 9.32%) 及质膜 (123 个, 5.76%) 等部位, 其中线粒体富集的差异蛋白数量相对较多 (图 6)。由此推测, HJB 可能经损伤线粒体途径诱导 MCF-7 细胞发生凋亡。

3.7 差异表达蛋白的 GO 富集分析

GO 富集分析结果显示 (图 7), HJB 发挥抗乳腺癌的作用是通过影响多个生物过程 (BP) 实现的, 包括 SRP 依赖性共翻译蛋白靶向膜 (SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane)、蛋白-DNA 复合物组装 (protein-DNA complex assembly)、蛋白-脂质复合物重塑 (protein-lipid complex remodeling); 细胞组分 (CC) 主要包括内质网 (endoplasmic reticulum)、内质网膜 (endoplasmic reticulum membrane)、内质网亚区 (endoplasmic reticulum sub-compartment); 分子功



红色代表上调蛋白，蓝色代表下调蛋白，灰色表示对应样本中不可定量；颜色的深浅表达上调或下调的程度。
Red indicates upregulated proteins, blue indicates downregulated proteins, and gray represents proteins that could not be quantified in corresponding sample. Color intensity reflects degree of upregulation or downregulation.

图 5 化合物差异蛋白表达量聚类柱状图 (A)、火山图 (B)、热图 (C)

Fig. 5 Clustering bar chart (A), volcano plot (B), and heatmap (C) showing expression levels of differentially expressed proteins upon compound treatment

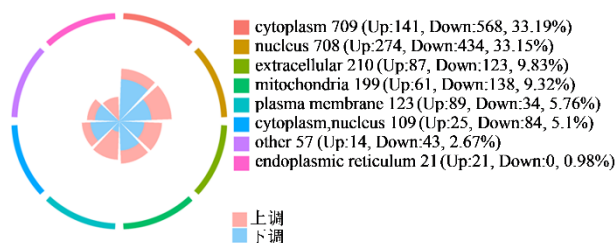


图 6 亚细胞结构注释分类

Fig. 6 Subcellular structure annotation classification

能 (MF) 主要有血红素结合 (heme binding)、核糖体结构成分 (structural constituent of ribosome)、糖胺聚糖结合 (glycosaminoglycan binding)。

3.8 差异表达蛋白的 KEGG 通路分析

通过 Metascape 工具进行 KEGG 富集分析，结果见图 8。差异表达蛋白显著富集于癌症相关通路、癌症中的微 RNA 等肿瘤发生发展相关通路，同时在 GSH 代谢信号通路中也呈现高度富集趋势。

3.9 差异表达蛋白 PPI 网络分析

本研究基于 STRING 数据库对差异表达蛋白进行系统分析，构建 PPI 网络 (图 9)。通过网络拓扑分析，筛选出关联度 ≥ 20 的核心蛋白 50 个，包括核糖体蛋白 L6 (RPL6)、核糖体蛋白 L3 (RPL3)、核糖体蛋白 S6 (RPS6)、核糖体蛋白 S12 (RPS12)、核糖体蛋白 13 (SNU13)、核糖体蛋白 L8 (RPL8)、酸性核糖体磷酸化蛋白 P0

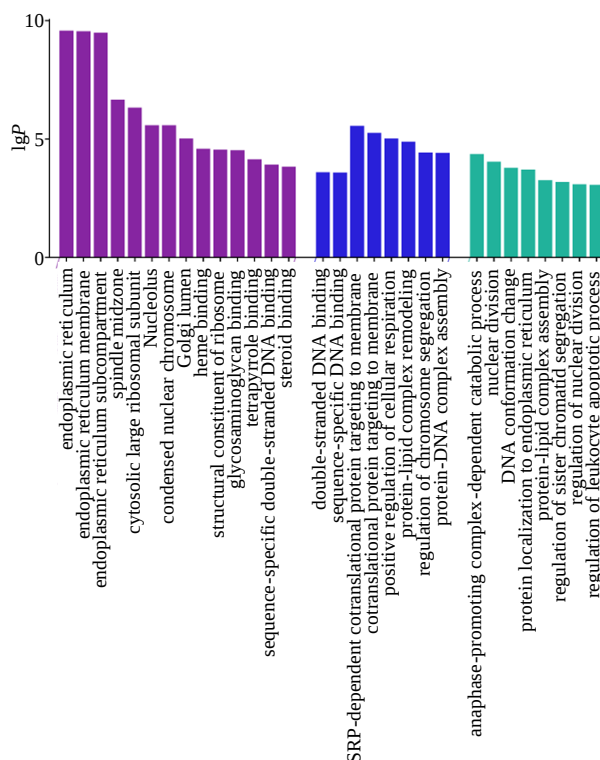


图 7 GO 富集分析三合一图

Fig. 7 GO enrichment analysis (three-in-one)

(RPLP0)、核糖体蛋白 L13A (RPL13A)、核糖体蛋白 L35A (RPL35A) 等，揭示了这些蛋白在 PPI 网络中的枢纽地位。这一发现表明化合物 HJB 在 MCF-7 细胞氧化还原生物进程中发挥着至关重要的作用。

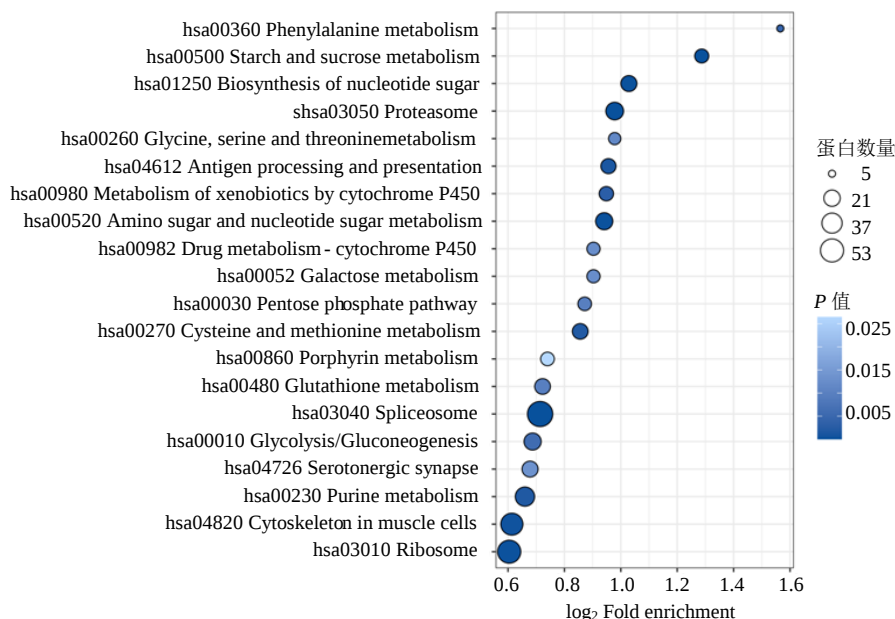


图 8 KEGG 通路富集分析

Fig. 8 KEGG pathway enrichment analysis

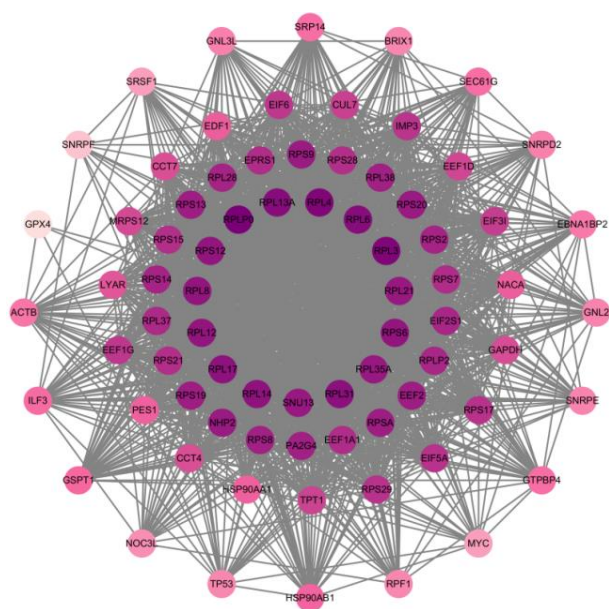


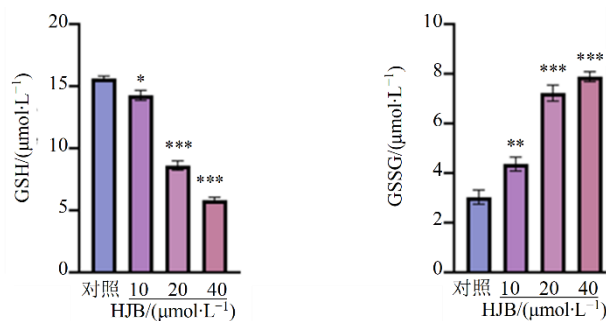
图 9 PPI 网络分析结果

Fig. 9 Results of PPI network analysis

3.10 HJB 对 MCF-7 细胞中 GSH 和 GSSG 含量的影响

与对照组相比,不同浓度 HJB 处理 MCF-7 细胞后,细胞内 GSH 含量呈浓度相关性下降, GSSG 含量呈浓度相关性升高,中、高浓度组差异显著 ($P < 0.001$),说明 HJB 显著破坏 MCF-7 细胞内 GSH 氧

化还原平衡,导致 GSH/GSSG 比值呈浓度相关性大幅降低,见图 10。结果表明, HJB 诱导细胞 GSH 氧化还原失衡与氧化应激,同时也是铁死亡发生的关键先决条件。



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

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

图 10 HJB 对 MCF-7 细胞中 GSH 和 GSSG 含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Effects of HJB on GSH and GSSG contents in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.11 HJB 对 MCF-7 细胞中 Fe^{2+} 和 ROS 的影响

与对照组相比,经 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HJB 处理后, RhoNox-6 荧光强度呈浓度相关性增强,同时, CM-H2DCFDA 荧光强度亦随浓度增加而逐渐升高,见图 11。结果表明, HJB 可浓度相关性地诱导 MCF-7 细胞内铁过载与氧化应激水平同步升高,为铁死亡的发生提供了直接的细胞学

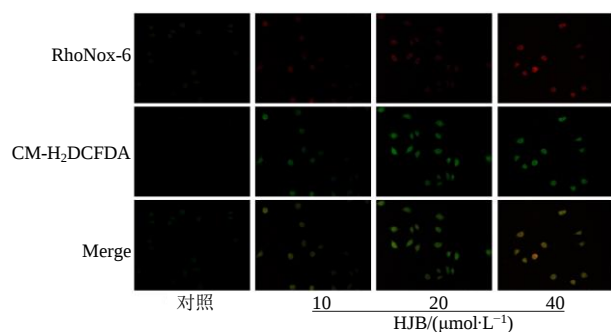
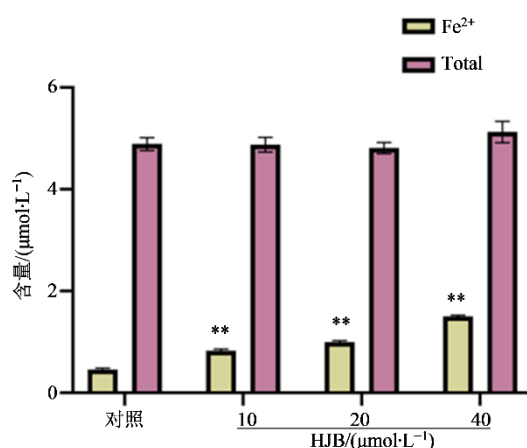


图 11 HJB 对 MCF-7 细胞中 Fe^{2+} 和 ROS 的影响
Fig. 11 Effect of HJB on Fe^{2+} and ROS in MCF-7 cells

证据。

3.12 HJB 对 MCF-7 细胞中总铁离子与 Fe^{2+} 含量的影响

与对照组相比,不同浓度 HJB(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 MCF-7 细胞后,细胞内 Fe^{2+} 含量呈浓度相关性显著升高 ($P < 0.01$),而总铁离子含量在各组间无明显差异,见图 12,结果表明,HJB 可诱导细胞内亚铁离子的积累,符合铁死亡特征。



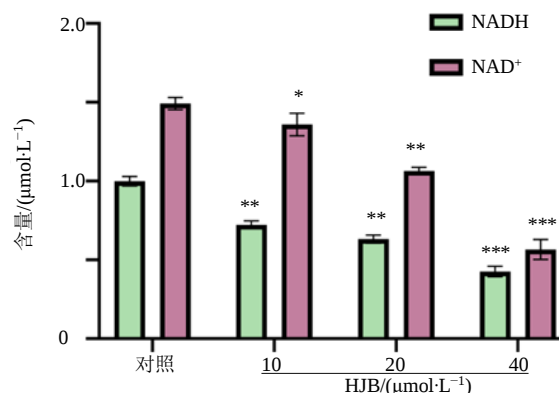
与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group.

图 12 HJB 对 MCF-7 细胞中总铁离子与 Fe^{2+} 含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 12 Effects of HJB on total iron and Fe^{2+} levels in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.13 HJB 对 MCF-7 细胞中 NAD^+/NADH 含量的影响

与对照组相比,不同浓度 HJB(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 MCF-7 细胞后,细胞内 NAD^+ 与 NADH 含量均呈浓度相关性显著下降,见图 13,结果表明,HJB 诱导的氧化应激和铁死亡破坏了细胞内的 NAD^+/NADH 氧化还原稳态。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 13 HJB 对 MCF-7 细胞中 NAD^+/NADH 含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 13 Effects of HJB on NAD^+/NADH contents in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.14 HJB 对 MCF-7 细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响

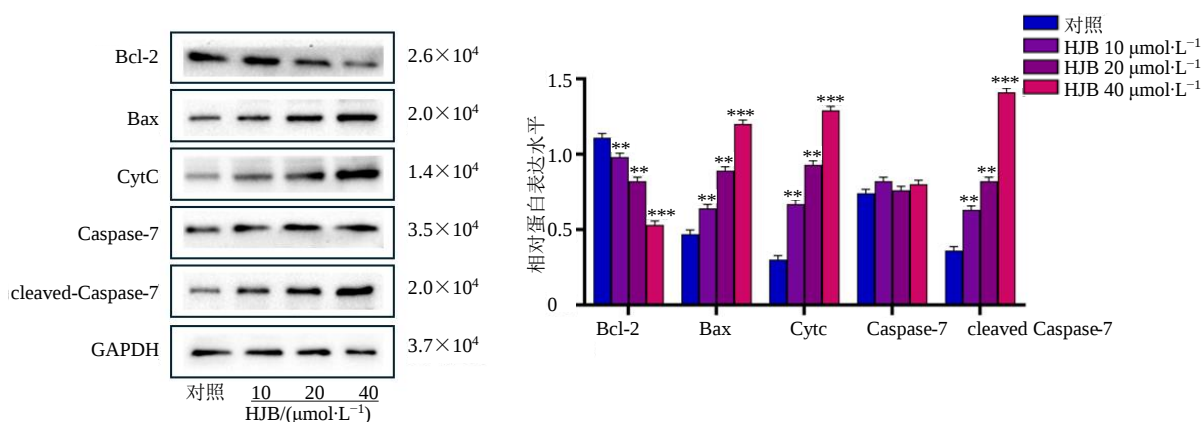
相较于对照组,各浓度 HJB 处理后 Caspase-7 表达无明显变化;而各浓度组 CytC、Bax 及 cleaved Caspase-7 表达均显著上调 ($P < 0.01$ 、 0.001),Bcl-2 表达则明显下降 ($P < 0.01$ 、 0.001),见图 14。结果提示 HJB 能激活线粒体凋亡通路,从而促进 MCF-7 细胞凋亡。

3.15 HJB 对 MCF-7 细胞铁死亡通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,经各浓度 HJB 处理后,MCF-7 细胞内 SLC7A11、GCLC、GR、GPX4 及 HBB 蛋白水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001),见图 15。结果提示 HJB 可激活 MCF-7 细胞铁死亡相关通路,继而诱导肿瘤细胞凋亡。

3.16 分子对接

经蛋白组学差异蛋白雷达图构建 PPI 网络,筛选获得 50 个高关联蛋白,其中 GSH、GSSG 及 GPX4 处于代谢信号通路的上下游关键节点,故对 HJB 与上述 3 种分子的结合能力进行了分子对接验证。结果显示 HJB 与三者均存在多个结合位点,可能通过干预其关键空间结构域而调控酶活性。具体而言,GSH 中 ARG-13、GLY-14 及 ALA-208 残基与 HJB 羟基氧原子形成 4 条氢键;GSSG 中 ARG-352 残基与 HJB 羟基氧原子形成 2 条氢键;GPX4 中 ARG-33 及 ASN-146 残基与 HJB 羟基氧原子形成 2 条氢键。蛋白质-配体复合物的结合能分别达到

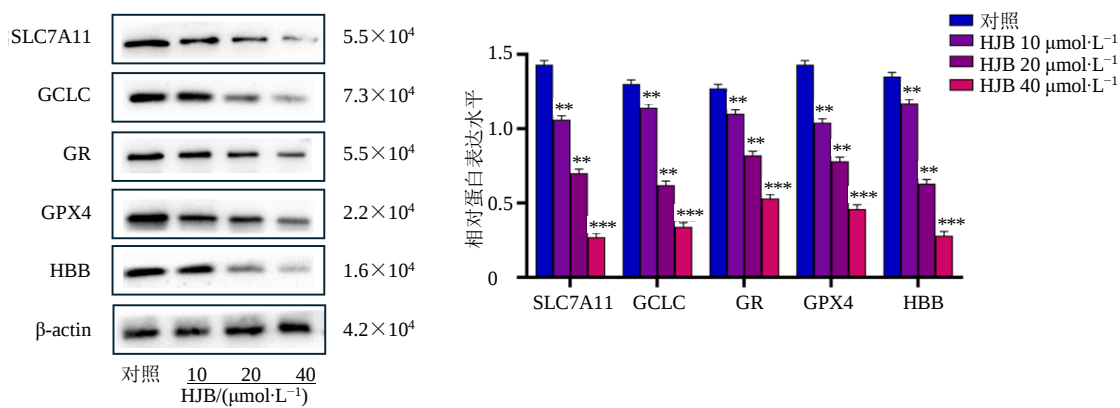


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

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

图 14 HJB 对 MCF-7 细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 14 Effect of HJB on expression of mitochondrial apoptosis-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 15 HJB 对 MCF-7 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 15 Effect of HJB on expression of ferroptosis-related proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

$-37.656 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (GSH)、 $-27.20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (GSSG)、 $-34.31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (GPX4)，能形成稳定的配合物。结果见图 16。

4 讨论

乳腺癌为女性群体高发恶性肿瘤，亦是女性癌症致死的首要病因。据世界卫生组织相关数据预估，全球每年乳腺癌新发患者约 230 万例，死亡人数达 68.5 万例。现已成为世界上诊断最频繁的癌症，超过了肺癌^[19]。目前临床化疗药物普遍存在不良反应大、肿瘤耐药性强的问题，为降低化疗对机体的损伤并克服耐药，从天然植物中发掘低毒高效的抗癌活性物质，始终是国内外抗肿瘤药物研发的核心热点^[20]。本研究以 MCF-7 细胞为模型，结合细胞功能实验、蛋白质组学与分子

对接技术，系统探讨 HJB 抑制乳腺癌细胞增殖的作用及分子机制，为其开发为抗乳腺癌候选药物提供实验依据。

铁死亡的过程涉及亚铁离子积累、自由基产生、抗氧化系统功能障碍和脂质过氧化^[21-23]。System xc^- （关键亚基 SLC7A11）负责转运胱氨酸进入细胞，是合成 GSH 的限速步骤。GSH 是关键还原底物，GPX4 是唯一能直接降解脂质过氧化物的抗氧化酶^[24-26]。在本研究中，HJB 抑制 System xc^- 介导的胱氨酸摄取后，胞内 GSH 合成受阻，GSH 耗竭直接导致 GPX4 失活、脂质过氧化物无法被清除，启动铁死亡程序；另一方面，GSH 耗竭引发的氧化应激可直接攻击线粒体膜结构，诱导线粒体通透性转换孔开放、线粒体膜电位崩塌，促进细胞色素 C

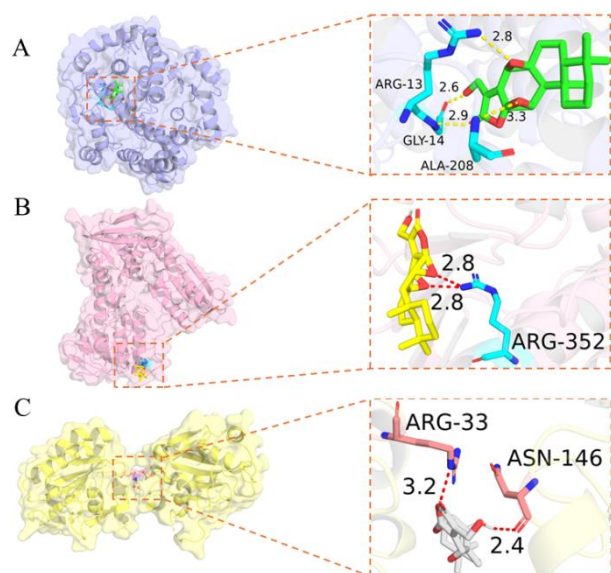


图 16 化合物 HJB 与 GSH (A)、GSSG (B) 和 GPX4 (C) 的分子对接

Fig. 16 Molecular docking of compound HJB with GSH (A), GSSG (B), and GPX4 (C)

释放, 并激活 Caspase 级联反应, 最终启动线粒体凋亡通路。2 种细胞死亡方式均依赖于 GSH 耗竭这一共同上游节点。2 条通路激活后, 其下游效应分子可形成相互促进的正反馈, 进一步强化细胞杀伤效应。一方面, 铁死亡过程中大量累积的脂质过氧化物与 ROS 可进一步加重线粒体氧化损伤, 促进细胞色素 C 释放与 Caspase-7 活化, 放大线粒体凋亡信号; 另一方面, 活化的 Caspase-7 可通过降解铁蛋白重链 (FTH1) 等铁储存蛋白, 促进铁蛋白降解释放游离 Fe^{2+} , 加剧细胞内铁过载, 同时还可抑制 System xc^- 转运体的功能, 进一步降低 GSH 合成, 削弱 GPX4 的抗氧化活性, 从而放大铁死亡信号^[27-29]。既往关于 HJB 抗肿瘤机制的研究多聚焦于细胞凋亡 JAK 家族激酶等经典信号靶点^[30-31], 尚未见其调控铁死亡的相关报道, 本研究将 HJB 的作用机制从单一凋亡模式拓展至“铁死亡+线粒体凋亡”双重死亡模式, 阐明了 HJB 通过靶向 GSH 代谢通路发挥抗肿瘤作用的新机制, 且分子对接结果进一步证实了其通路核心分子的直接结合能力, 为该化合物的靶点研究提供了新方向。研究中 GO 与 KEGG 富集分析显示, HJB 主要影响蛋白转运、氧化还原稳态及 GSH 代谢通路, 为 GSH 失衡介导的铁死亡机制提供了组学依据。MTT 结果显示, HJB 可浓度与时间相关性抑制 MCF-7 细胞增殖, HJB 在 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 30.49、23.93、

19.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 具有显著的体外抑瘤活性。流式与共聚焦结果显示, HJB 可显著提升细胞凋亡率, 诱导线粒体膜电位下降、ROS 水平升高, 说明 HJB 通过线粒体损伤途径启动氧化应激并介导凋亡。进一步机制研究表明, HJB 可显著降低 GSH、升高 GSSG, 使 GSH/GSSG 下降, 破坏氧化还原平衡; 同时特异性诱导 Fe^{2+} 积累而总铁趋于不变, 伴随 ROS 与脂质过氧化增强, 符合铁死亡特征。HJB 还可降低 NAD^+/NADH 水平, 进一步加剧氧化应激。Western blotting 结果显示, HJB 显著下调 SLC7A11、GCLC、GR、GPX4 蛋白表达, 导致 System xc^- -GSH-GPX4 轴崩溃, 直接触发铁死亡。与此同时, HJB 上调 Bax、CytC、cleaved Caspase-7, 下调 Bcl-2, 激活线粒体凋亡通路。分子对接显示, HJB 可与 GSH、GSSG、GPX4 形成稳定氢键结合, 从结构层面证实其可直接靶向铁死亡关键分子。

HJB 通过抑制 System xc^- -GSH-GPX4 轴功能, 破坏细胞氧化还原稳态, 触发铁死亡, 同时激活内源性线粒体凋亡通路, 两条通路以氧化应激为核心节点形成正反馈串扰, 协同发挥肿瘤细胞杀伤效应。本研究为 HJB 作为抗乳腺癌候选天然活性成分的后续开发提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Guo H. Interactions between the tumor microbiota and breast cancer [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 14: 1499203.
- [2] Lin H C, Lin J Y. GSF3, a polysaccharide from guava (*Psidium guajava* L.) seeds, inhibits MCF-7 breast cancer cell growth via increasing Bax/Bcl-2 ratio or *Fas* mRNA expression levels [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 161: 1261-1271.
- [3] Kang J H, Jang J E, Mishra S K, et al. Ergosterol peroxide from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the β -catenin pathway in colorectal cancer [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 173: 303-312.
- [4] Sun Y X, Liu J C. Chemical constituents and biological activities of *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Chem Biodivers, 2011, 8(7): 1205-1214.
- [5] Jian B Y, Zhang H, Han C C, et al. Anti-cancer activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* Steud [J]. Molecules, 2018, 23(2): 387.

- [6] Li Y N, He J, Zhang J, et al. Existing knowledge on *Euphorbia fischeriana* Steud. (*Euphorbiaceae*): Traditional uses, clinical applications, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114095.
- [7] Wang Y, Ma X Q, Yan S S, et al. 17-hydroxy-jolkinolide B inhibits signal transducers and activators of transcription 3 signaling by covalently cross-linking Janus kinases and induces apoptosis of human cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7302-7310.
- [8] 邓思琦, 曾乐冰, 郭常怡, 等. 基于网络药理学和实验验证探究 17-羟-岩大戟内酯 B 通过 PI3K-Akt 信号通路介导线粒体凋亡途径诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(12): 3065-3075.
- Deng S Q, Zeng L B, Guo C Y, et al. Mechanism of 17-hydroxy-rockcaprolactone B in inducing apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through the mitochondrial apoptosis pathway mediated by the PI3K-Akt pathway based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Drugs Clin*, 2024, 39(12): 3065-3075.
- [9] 王晓丽, 周丽, 刘吉成. 17-羟-岩大戟内酯 B 对 K562 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(9): 197-200.
- Wang X L, Zhou L, Liu J C. Effect of 17-hydroxy-jolkinolide B on proliferation and apoptosis of K562 cells [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2013, 19(9): 197-200.
- [10] Dong M H, Zhang Q, Wang Y Y, et al. *Euphorbia fischeriana* Steud inhibits malignant melanoma via modulation of the phosphoinositide-3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1475-1480.
- [11] Zhang X D, Liu Z Y, Wang M S, et al. Mechanisms and regulations of ferroptosis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1269451.
- [12] McGinley C, Adeyemi O, Oyolola O, et al. Redox state of glutathione and cysteine in plasma following acute stroke [J]. *Antioxidants*, 2026, 15(1): 117.
- [13] Liu T, Sun L, Zhang Y B, et al. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(1): e22942.
- [14] Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, et al. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013(1): 972913.
- [15] Gilbert H, Yoon D, Sergueeva A I, et al. HIF1 induced glutathione dysregulation in platelets associated with increased risk of vascular disease in chuvash polycythemia [J]. *Blood*, 2008, 112(11): 1906.
- [16] Tarangelo A, Magtanong L, Bieging-Rolett K T, et al. p53 suppresses metabolic stress-induced ferroptosis in cancer cells [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 569-575.
- [17] Mou Y H, Wang J, Wu J C, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [18] Patwekar M, Patwekar F, Kari Z A, et al. Efficacy and mechanisms of CDK4/6 inhibitors in breast cancer: Advancing targeted therapeutic strategies [J]. *Oncol Res*, 2026, 34(4): 1-10.
- [19] Islam M R, Akash S, Rahman M M, et al. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 368: 110170.
- [20] Lai Y P, Huang C X, Wu J Q, et al. Ferroptosis in Cancer: A new perspective on T cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 143: 113539.
- [21] Jiang X J, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [22] Diao J D, Jia Y Y, Dai E Y, et al. Ferroptotic therapy in cancer: Benefits, side effects, and risks [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 89.
- [23] Tong Y, Wu Y G, Ma J, et al. Comparative mechanistic study of RPE cell death induced by different oxidative stresses [J]. *Redox Biol*, 2023, 65: 102840.
- [24] Zhang L, Hu Z G, Li Z X, et al. Crosstalk among mitophagy, pyroptosis, ferroptosis, and necroptosis in central nervous system injuries [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(8): 1660-1670.
- [25] Yong Y Y, Yan L, Wei J, et al. A novel ferroptosis inhibitor, Thonningianin A, improves Alzheimer's disease by activating GPX4 [J]. *Theranostics*, 2024, 14(16): 6161-6184.
- [26] Ai Y W, Meng Y T, Yan B, et al. The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death [J]. *Mol Cell*, 2024, 84(1): 170-179.
- [27] Glover H L, Schreiner A, Dewson G, et al.

