

基于 SLC7A11/GPX4 轴探讨西黄丸含药血清对肝癌细胞铁死亡的影响

王 艳, 任超云, 董文凯, 王文慧, 申笑语, 王颖莉*

山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

摘 要: **目的** 探讨西黄丸调控铁死亡途径抑制肝癌的作用机制。**方法** 选用 HepG2 细胞采用 CCK-8 法研究西黄丸低、中、高剂量 (0.65、1.30、2.60 g·kg⁻¹) 制备的 10% 含药血清干预给药 24、48 h 对细胞增殖的抑制作用, 以获得最佳给药浓度及时间, 并采用透射电镜观察西黄丸各剂量含药血清对细胞线粒体形态的影响。HepG2 细胞分为对照组、西黄丸组、质粒空载组 (NC)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 过表达质粒转染组 (OE-SLC7A11)、西黄丸+OE-SLC7A11 组。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 法检测 SLC7A11 转染效率; 采用 Edu 法检测细胞增殖率; 采用二氢乙锭 (DHE) 荧光探针染色法及试剂盒法检测细胞活性氧 (ROS) 含量及活力水平; 比色法检测丙二醛 (MDA) 水平和谷胱甘肽 (GSH) 水平; 分别采用普鲁士蓝染色法观察铁沉积及比色法测定细胞内亚铁离子 (Fe²⁺) 水平; 采用 Western blotting 法及 qRT-PCR 法检测各组细胞 SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 水平。**结果** CCK-8 实验研究结果表明, 与对照组相比, 西黄丸含药血清干预给药 24、48 h 可显著抑制细胞增殖 ($P<0.05$ 、 0.01), 其中高剂量组作用效果最显著, 干预给药 24 h 抑制增殖效果最佳; 透射电镜观察结果显示, 西黄丸含药血清干预可引起 HepG2 线粒体肿胀、线粒体嵴模糊甚至消失等细胞铁死亡的表现, 高剂量组线粒体损伤最显著。SLC7A11 质粒转染引起的铁死亡抑制细胞实验中, 与对照组比较, OE-SLC7A11 组 SLC7A11 蛋白及 mRNA 水平均显著提高 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明转染成功。与对照组比较, 西黄丸组 Edu 阳性细胞率、GSH 水平下降, MDA、ROS、Fe²⁺ 水平显著上升 ($P<0.01$), SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01); 与对照组比较, OE-SLC7A11 组 Edu 阳性细胞率、GSH 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), MDA、ROS 水平显著下降 ($P<0.01$), Fe²⁺ 水平无明显差异, SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$)。与 OE-SLC7A11 组比较, 西黄丸+OE-SLC7A11 组 MDA、ROS、Fe²⁺ 水平显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01), Edu 阳性细胞率、GSH 水平下降 ($P<0.01$); SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 表达水平显著上升 ($P<0.01$)。**结论** 西黄丸可通过下调 SLC7A11/GPX4 轴, 诱导肝癌细胞铁死亡, 从而发挥治疗肝癌作用。

关键词: 西黄丸; 肝癌; 铁死亡; SLC7A11/GPX4 轴; 含药血清

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)08-2689-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.006

Effect of Xihuang Pill drug-containing serum on hepatocellular carcinoma cells ferroptosis based on SLC7A11/GPX4 signaling pathway

WANG Yan, REN Chaoyun, DONG Wenkai, WANG Wenhui, SHEN Xiaoyu, WANG Yingli

College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism by which Xihuang Pill inhibits hepatocellular carcinoma through modulation of the ferroptosis pathway. **Methods** HepG2 cells were treated with low-, medium-, and high-dose (0.65, 1.30, and 2.60 g·kg⁻¹) Xihuang Pill-medicated serum. The CCK-8 assay was employed to evaluate the inhibition of cell proliferation at 24 h and 48 h, thereby identifying the optimal concentration and treatment duration. Subsequently, transmission electron microscopy was utilized to observe changes in mitochondrial morphology induced by each dose of the medicated serum. A ferroptosis-inhibited model was established by transfecting cells with an SLC7A11 overexpression plasmid. HepG2 cells were divided into the following groups: control group, Xihuang Pill high-dose-medicated serum group, empty plasmid group, SLC7A11 overexpression plasmid transfection group (OE-SLC7A11), and SLC7A11 overexpression plasmid transfection combined with Xihuang Pill-medicated serum intervention group (OE-

收稿日期: 2026-03-26

基金项目: 山西省自然科学基金面上项目 (202203021221205); 山西中医药大学中药药剂学科建设项目 (2026XK36)

作者简介: 王 艳 (1981—), 女, 副教授, 研究方向为中药复方药效机制研究。E-mail: wy180119@sxtcm.edu.cn

*通信作者: 王颖莉 (1958—), 女, 教授, 研究方向为中药复方制剂研究。E-mail: wyl@sxtcm.edu.cn

SLC7A11+Xihuang Pill). Western blotting and qRT-PCR were used to detect transfection efficiency; the EdU assay was adopted to determine cell proliferation rate. The levels of reactive oxygen species (ROS) were measured using the dihydroethidium(DHE) fluorescent probe staining method; Malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels were measured using colorimetric assays; Iron deposition was observed using Perls Prussian blue staining, and intracellular Fe^{2+} levels were determined by colorimetric assay; Western blotting and qRT-PCR were used to detect the protein and mRNA levels of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in each group. **Results** The results of the CCK-8 assay demonstrated that, compared with the control group, Xihuang Pill-medicated serum significantly inhibited HepG2 cell proliferation at 24 and 48 h ($P < 0.05, 0.01$). The high-dose group exhibited the most pronounced inhibitory effect, with optimal inhibition observed at 24 h. Transmission electron microscopy (TEM) revealed that Xihuang Pill-medicated serum treatment induced mitochondrial swelling, cristae blurring, and even cristae loss in HepG2 cells, which are characteristic morphological features of ferroptosis. These mitochondrial alterations were most prominent in the high-dose group. In the ferroptosis inhibition experiment induced by SLC7A11 plasmid transfection, the following results were observed. Compared with the NC group, both SLC7A11 protein and mRNA levels were significantly elevated in the OE-SLC7A11 group ($P < 0.05, 0.01$), indicating successful transfection. Compared with the control group, the Xihuang Pill group exhibited a significant decrease in GSH levels and Edu-positive cell rate, along with marked increases in MDA, ROS, and Fe^{2+} levels ($P < 0.01$). The protein and mRNA expression levels of SLC7A11 and GPX4 were also significantly downregulated in the Xihuang Pill group ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the NC group, the OE-SLC7A11 group showed significantly elevated GSH levels and Edu-positive cell rate ($P < 0.01$), reduced MDA and ROS levels ($P < 0.01$) and significantly upregulated protein and mRNA expression of SLC7A11 and GPX4 ($P < 0.05, 0.01$), and there was no significant difference in intracellular Fe^{2+} levels of the OE-SLC7A11 group. Compared with the OE-SLC7A11 group, the OE-SLC7A11 + Xihuang Pill group displayed significantly increased MDA, ROS, and Fe^{2+} levels ($P < 0.05, 0.01$), decreased GSH levels and Edu-positive cell rate ($P < 0.01$), and significantly downregulated protein and mRNA expression of SLC7A11 and GPX4 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Xihuang Pill exerts its therapeutic effect on hepatocellular carcinoma by down-regulating the SLC7A11/GPX4 axis to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells.

Key words: Xihuang Pill; hepatocellular carcinoma; ferroptosis; SLC7A11/GPX4 axis; drug containing serum

肝癌在全世界范围内的致死率在癌症中居第 2 位, 且其发病率逐年上升^[1], 我国是肝癌的高发国, 每年新发病例占全球新发病例的 45%~50%。肝细胞癌占原发性肝癌的 75%~85%, 具有恶性程度高、进展快、预后差等特点。由于其发病隐匿, 仅有不到 30% 的患者适合接受根治治疗, 临床上对于不可手术的肝癌患者药物治疗以多酶抑制剂、免疫检查点抑制剂等为主^[2], 但仅有少数患者获益。近年来铁死亡在抗肿瘤研究中展现出巨大的潜力, 通过药物诱导肿瘤细胞铁死亡, 可以有效地抑制肿瘤的生长和发展^[3], 因此获得对铁死亡具有显著促进效应的治疗药物对延缓肿瘤的进程具有积极治疗效应。

中医学将肝癌纳入“肝积”“黄疸”等范畴, 并认为其病因为脾胃受损、肝气郁结等, 导致气滞、血瘀、毒结, 因此治疗需注重应用活血祛瘀、清热解毒、补气健脾等功效的药物。西黄丸出自《外科证治全生集》, 在肿瘤的治疗中具有悠久的历史。临床研究证实, 西黄丸对癌症患者生活质量的提高、临床症状的改善等方面疗效确切^[4-5]。多项实验研究表明, 西黄丸可通过调节肿瘤免疫微环境、抑制肿瘤血管生成等多途径起到抗肿瘤作用^[6-7]。

课题组前期研究表明, 西黄丸可提高 H22 荷瘤小鼠的生存率, 显著抑制肿瘤体积及质量^[8], 体外实验结果表明西黄丸可显著抑制 HepG2 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并证实其对肝癌细胞增殖的抑制与调控信号传导及转录激活因子 3 (STAT3) 有关^[9]。已有研究表明 STAT3 的磷酸化可下调肿瘤蛋白 p53 (p53) 的表达^[10], p53 可结合 *SLC7A11* 启动子区域并抑制其转录, 这对于诱导肿瘤细胞铁死亡至关重要^[11]。而西黄丸对肝癌的抑制作用是否与诱导肝癌细胞铁死亡相关, 尚未开展相关研究。因此本研究从铁死亡角度出发, 采用 HepG2 细胞构建溶质载体家族 7 成员 11 (*SLC7A11*) 过表达质粒诱导的铁死亡抑制细胞模型, 评价西黄丸含药血清对肝癌细胞铁死亡的诱导效应, 为经典名方西黄丸抗肿瘤作用机制的阐明及其临床应用奠定实验基础。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级 SD 大鼠, 6~7 周龄, 雄性, 体质量 230~250 g, 生产许可证号 SCXK (京) 2023-0001, 购自斯贝福 (北京) 生物科技有限公司, 批号 2023-06-13, 实验动物伦理号 2022DW263。人肝癌细胞

HepG2, 购自上海泛柯实业有限公司。

1.2 药品与试剂

西黄丸(批号 20230501010)购自山西振东安欣生物制药有限公司; DMEM 高糖培养基(货号 G4511-500ML)、青霉素-链霉素溶液(货号 GA2312026)、蛋白酶抑制剂 PMSF(货号 CR2303056)、磷酸化蛋白酶抑制剂(货号 CR2307130)、CCK-8 细胞增殖检测试剂盒(货号 G1613)、电转缓冲液(货号 G2154-1L)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; RPMI 1640 培养基(货号 JC15FC0268)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 胎牛血清(货号 SA211.02)购自赛澳美细胞技术有限公司; 胰蛋白酶消化液(货号 MA0232)美仑生物技术有限公司; 二甲基亚砜(DMSO, 货号 D8371)、TBS 缓冲液(货号 G0001)、HRP-羊抗兔(货号 GB23303)、蛋白上样缓冲液(货号 P1041)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 20230629), 北京索莱宝科技有限公司; SDS-PAGE 彩色凝胶制备试剂盒(货号 PMK1013B)购自武汉普美克生物技术有限公司; Quick Block TM Western 封闭液(货号 P0252)购自碧云天生物技术有限公司; 超敏化学发光底物检测试剂盒(货号 PC001-2)购自陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司; 细胞/组织总 RNA 快速提取试剂盒(货号 M5105)购自苏州新赛美生物技术有限公司; All-in-one RT EasyMix for qPCR 试剂盒(货号 23N01601)购自吐露港生物技术有限公司。亚铁离子(Fe^{2+})测试盒(货号 A039-2-1)、活性氧(ROS)测试盒(货号 E004-1-1)、丙二醛(MDA)测试盒(货号 A003-1-2)、谷胱甘肽(GSH)测试盒(货号 A500-1-2)购自南京建成生物技术有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)(货号 CY6959)一抗购自 Abways 公司; SLC7A11/xCT polyclonal antibody(货号 00138060)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]; Axioscope 5 荧光显微镜[蔡司科技(苏州)有限公司]; Amersham ImageQuant 800 Western 印迹成像分析仪(Cytiva 公司); HC-2518 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); YD-12P 组织脱水机、YD-6L 石蜡切片机生物组织包埋机、YD-AB 生物组织摊烤片机(金华市益迪医疗设备有限公司); 电泳仪、转膜仪(Bio-Rad 公司); Archime X4 荧光

定量 PCR 仪(鲲鹏基因科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

含药血清制备按照文献报道方法^[12], 按体表面积折算法计算 SD 大鼠等效量, 西黄丸组低、中、高剂量组分别 ig 西黄丸 0.65、1.30、2.60 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 连续给药 7 d, 末次给药, 分别于给药 1 h 后, 用小动物呼吸麻醉机麻醉, 腹主动脉取血, 血液样本在室温条件下静置 2 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血清并于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌, 无菌冻存管分装并置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2 细胞分组

2.2.1 含药血清浓度筛选 将 HepG2 细胞分为对照组和西黄丸含药血清低、中、高剂量(0.65、1.30、2.60 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 以明确含药血清最佳干预剂量, HepG2 细胞贴壁后, 对照组中加入培养基, 其余各组分别加入 10% 的含药血清, 分别干预 24、48 h。

2.2.2 铁死亡研究 HepG2 细胞分为对照组、西黄丸组、SLC7A11 空载质粒(NC)组、SLC7A11 过表达质粒组(OE-SLC7A11)、西黄丸+OE-SLC7A11 组; 对照组: HepG2 细胞加入完全培养基, 不做处理; 西黄丸组: HepG2 细胞加入 10% 西黄丸高剂量含药血清; NC 组: HepG2 细胞转染空载质粒; OE-SLC7A11 组: HepG2 细胞转染 SLC7A11 过表达质粒; 西黄丸+OE-SLC7A11 组: HepG2 细胞转染 SLC7A11 过表达质粒后加入 10% 西黄丸高剂量含药血清, 干预给药时间为 24 h。

2.3 CCK-8 法检测不同浓度西黄丸含药血清对细胞增殖的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞以 3×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 每孔 100 μL , 放入培养箱培养 24 h, 按照“2.2.1”项方法分组及给药处理细胞 24、48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 透射电镜观察检测不同质量浓度西黄丸含药血清对细胞线粒体形态的影响

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每皿 4×10^5 个接种于 6 cm 培养皿中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中 24 h 后, 按照“2.2.1”项方法处理细胞 24 h 后, 加入胰酶消化并分散细胞, 1 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min

后收集细胞，弃上清添加电镜固定液后将细胞团吹散，重新悬浮，2.5%戊二酸进行前固定，1%锇酸溶液后固定，梯度酒精脱水后进行包埋切片，以二氯化铀醋酸盐为原料染色，用蒸馏水冲洗，柠檬酸铅染色，烘干后用电子显微镜对其超微结构进行观察。

2.5 肝癌细胞过表达质粒转染

将对数生长期的 HepG2 细胞以每孔 1×10^5 个接种于含 500 μL 无抗生素培养基的 24 孔板中，设置 NC 组、OE-SLC7A11 组，每组设 5 个复孔，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养至细胞融合度达 70%~90%。取 0.8~1.0 μg 质粒 DNA 及 2~3 μL LipoHigh 转染试剂，分别用 50 μL 培养基稀释，室温静置 5 min 后等体积混合，再孵育 20 min 形成转染复合物。将复合物逐滴加入孔中，轻摇混匀，4 h 后更换为新鲜完全培养基，转染 24 h 后收集细胞。

2.6 Western blotting 检测转染效率

按照“2.5”项方法进行分组及处理，收集细胞，提取总蛋白，并采用 BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品采用 10%的分离胶与 5%的浓缩胶对其进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，凝胶电压为 80 V，分离胶电压为 120 V，PVDF 膜的湿转时间为 1.5 h，封闭 15 min 后加入 SLC7A11 (1:1 000) 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，用 TBST 快速洗涤 3 次，每次 10 min，加入二抗，室温孵育 1 h，TBST 洗涤，加入 ECL 化学发光试剂显影，并采用凝胶成像仪成像，通过 Image J 软件对目的条带分析。

2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SLC7A11 转染效率

按照“2.5”项方法进行分组及处理，收集细胞，按照 TRIzol 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA，测定浓度和纯度后，逆转录合成 cDNA 并进行扩增。反应体系为 20 μL ，首先 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min，然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min，循环 40 次。以 GAPDH 为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 SLC7A11 相对表达量，引物序列见表 1。

2.8 西黄丸含药血清对 OE-SLC7A11 转染细胞增殖的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞以每孔 1×10^5 个接种于放置有无菌细胞爬片的 24 孔板中，按照“2.5”项方案进行转染，转染 24 h 后按照“2.2.1”项分组及给药处理方案培养 24 h 后加入 Edu 溶液，培养 2 h 后，加入多聚甲醛（浓度 4%）进行固定，30 min 后，加入 Azide 488 染色液，并于避光条件

表 1 基因引物序列

Table 1 Sequences of primers for genes

引物名称	引物序列 (5'→3')
β -actin	F-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG R-ATGCCACAGGATTCCATACC
GPX4	F-ATAAGAACGGCTGCGTGGTGAAG R-TAGAGATAGCACGGCAGGTCCTTC
SLC7A11	F-ACCACCATCAGTGCGGAGGAG R-ATGGAGCCGAAGCAGGAGAGG
GAPDH	F-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG R-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

下进行孵育 30 min，接着 Hoechst33342 复染 10 min，并置于荧光显微镜下观察，通过 Image J 定量计算 EdU 阳性数及总细胞数，以 EdU 阳性细胞数占总细胞数的百分比表示增殖率。

2.9 西黄丸含药血清对 OE-SLC7A11 转染细胞 GSH、MDA 水平的影响

取处于对数生长期的 HepG2 细胞，调整细胞浓度为 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板，每孔加细胞悬液 4 mL，放入培养箱中培养 24 h。按照“2.2.2”项分组及给药方法处理细胞 24 h 后，PBS 冰上洗涤 3 次后收集细胞，并按照试剂盒说明书检测各组细胞中 MDA、GSH 含量。

2.10 西黄丸含药血清对 SLC7A11 过表达质粒转染细胞 ROS 荧光水平的影响

将细胞以每孔 1×10^5 个接种于放置有无菌细胞爬片的 24 孔板中，每组设 3 个复孔，按照“2.2.2”项分组及给药方法处理细胞 24 h 后，每孔加入无血清培养基稀释的 DCFH-DA（终浓度 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ），于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，弃培养基，PBS 洗涤 3 次，置于荧光显微镜下进行观察并进行图像采集。

采用比色法对细胞内 ROS 含量进行测定，按照“2.2.2”项分组及给药方法处理细胞 24 h 后，收集细胞，采用 BCA 法测定各组蛋白浓度，按照试剂盒说明书定量检测各组细胞中 ROS 含量。

2.11 西黄丸含药血清对 OE-SLC7A11 转染细胞铁沉积及 Fe^{2+} 水平的影响

采用 Perls 染色定性测定细胞内铁沉积，将细胞以每孔 1×10^5 个接种于放置有无菌细胞爬片的 24 孔板中，每组设 3 个复孔，按照“2.2.2”项分组及给药方法处理细胞 24 h 后，用 4%多聚甲醛固定，加入 Perls 染色工作液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，水洗后核固红复染，脱水后封片置于显微镜下观察。

采用比色法对细胞内 Fe^{2+} 浓度进行测定,按照“2.2.2”项分组及给药方法处理细胞 24 h 后,弃培养基, PBS 洗涤 3 次后收集细胞,按照试剂盒说明书检测 Fe^{2+} 水平。

2.12 西黄丸含药血清对 SLC7A11 过表达质粒转染细胞 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平的影响

按照“2.2.2”项分组及给药处理细胞 24 h 后,按照“2.6”项下方法检测 SLC7A11、GPX4、GAPDH 蛋白表达。

2.13 西黄丸含药血清对 SLC7A11 过表达质粒转染细胞 SLC7A11、GPX4 mRNA 水平的影响

按照“2.2.2”项分组及给药处理细胞 24 h 后,按照“2.7”项下方法检测 SLC7A11、GPX4、GAPDH mRNA 水平。

2.14 统计分析

采用 GraphPad Prism 9 软件对样本数据进行数

据处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),如数据不符合正态分布,则使用非参数检验。

3 结果

3.1 西黄丸含药血清对 HepG2 细胞增殖的影响

如图 1 所示,与对照组比较,西黄丸含药血清低、中、高剂量组干预 24 h 后,对细胞增殖具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01),高剂量组作用效果最显著;西黄丸含药血清中、高剂量组干预 48 h 后,对细胞增殖具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01),高剂量组作用效果最佳。含药血清干预 24 h 与干预 48 h 比较,干预 24 h 即展现出显著的抑制效果,因此后续对细胞线粒体形态的影响研究采用西黄丸含药血清低、中、高剂量组干预 24 h。

3.2 西黄丸对 HepG2 细胞线粒体形态的影响

如图 2 所示,对照组细胞线粒体体积正常,线

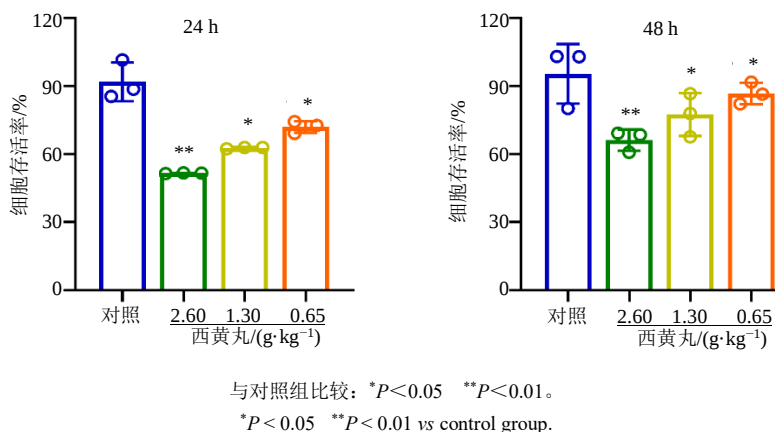


图 1 西黄丸含药血清对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inhibitory effect of Xihuang Pill-containing serum on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

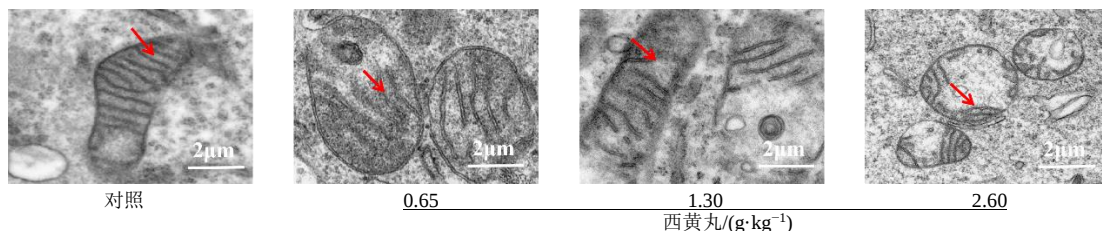


图 2 西黄丸含药血清对 HepG2 细胞的线粒体结构的影响

Fig. 2 Impact of Xihuang Pill-containing serum on mitochondrial morphology and structure of HepG2 cells

粒体嵴形态结构完整,与对照组相比,西黄丸各剂量组细胞线粒体结构均发生变化,存在线粒体肿胀变形,嵴结构发生断裂或消失的情况,高剂量组影响最为显著,结合“3.1”项研究结果,后续研究采用西黄丸含药血清高剂量进行研究。

3.3 SLC7A11 质粒转染效率检测

为明确 SLC7A11 质粒转染 HepG2 细胞效率,本研究分别采用 Western blotting 及 qRT-PCR 法检测转染细胞的 SLC7A11 蛋白及 mRNA 表达水平。如图 3 所示,与 NC 组相比,OE-

SLC7A11 组 SLC7A11 蛋白及 mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)，说明过表达 SLC7A11 质粒转染成功。

3.4 西黄丸对 SLC7A11 过表达质粒转染 HepG2 细胞增殖的影响

本研究采用 Hoechst/EdU 染色以明确西黄丸对

SLC7A11 过表达质粒转染 HepG2 细胞增殖的影响作用，如图 4 所示，与对照组相比，西黄丸组 Edu 阳性细胞率显著下降 ($P<0.01$)；与 NC 组相比，OE-SLC7A11 组阳性细胞率显著上升 ($P<0.05$)；与 OE-SLC7A11 组比较，西黄丸+OE-SLC7A11 组阳性细胞率显著下降 ($P<0.01$)。

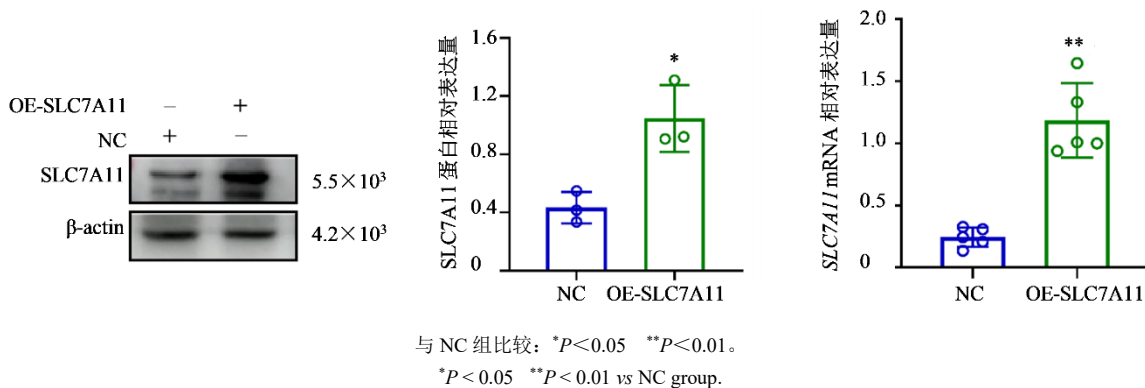


图 3 SLC7A11 质粒转染效率检测 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Assay for SLC7A11 plasmid transfection efficiency ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

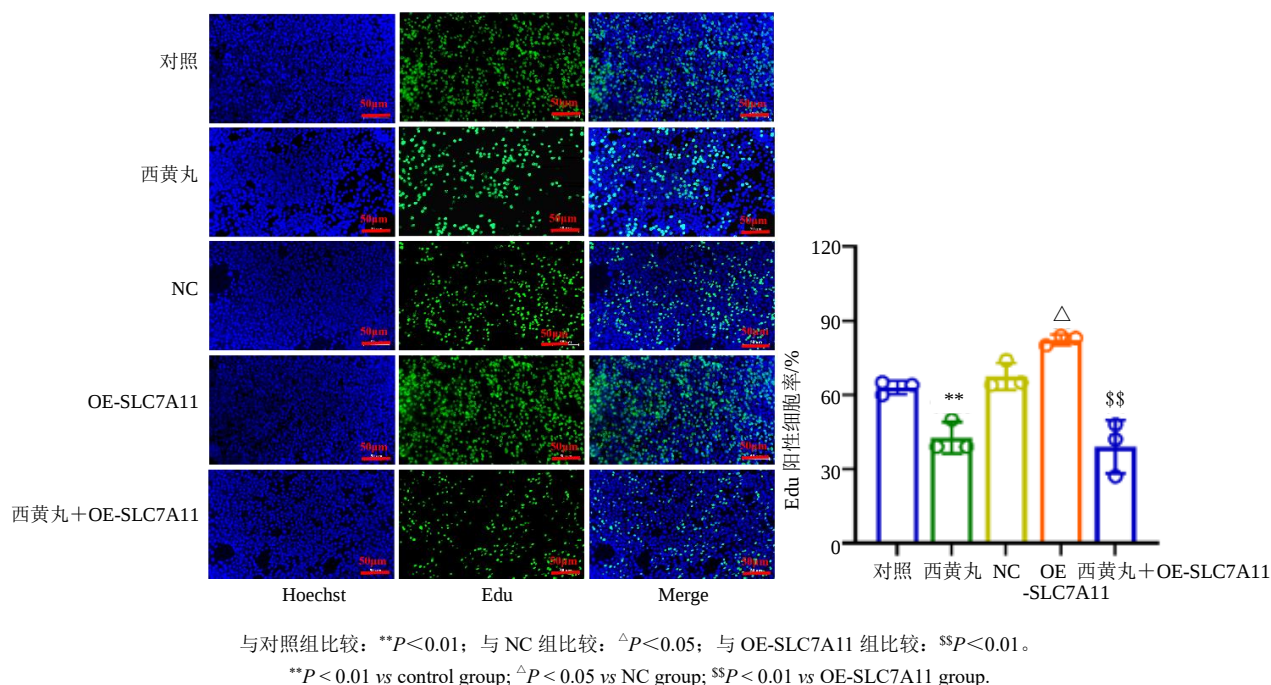


图 4 西黄丸含药血清对 SLC7A11 过表达质粒转染细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of Xihuang Pill containing serum on proliferation of SLC7A11 overexpression plasmid transfected cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5 西黄丸对 OE-SLC7A11 转染 HepG2 细胞 ROS 水平的影响

如图 5 所示，与对照组相比，西黄丸组 ROS 荧光强度增强，定量分析细胞内 ROS 活力水平显著

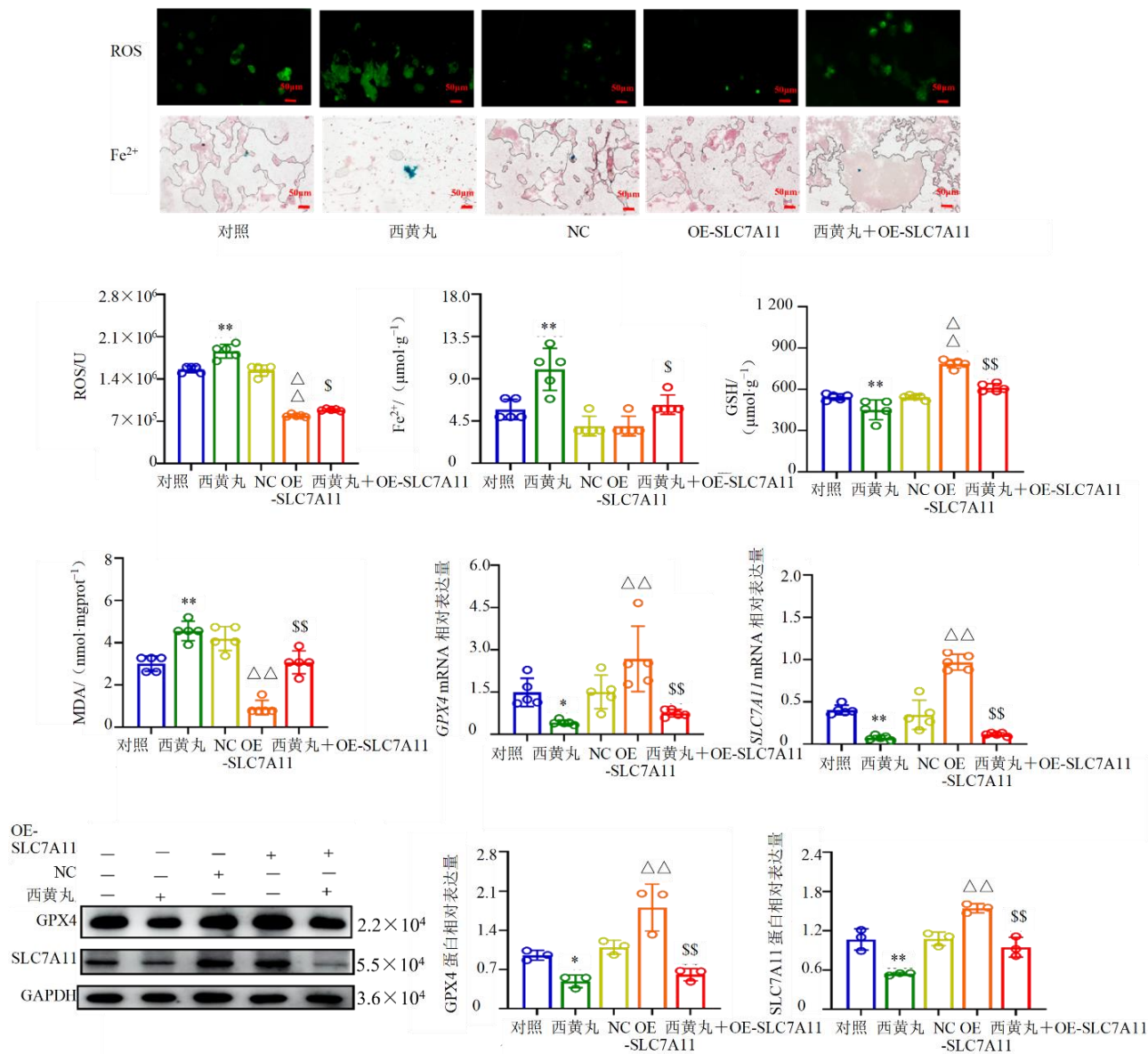
上升 ($P<0.01$)；与 NC 组相比，OE-SLC7A11 组 ROS 荧光强度降低，定量分析细胞内 ROS 活力水平显著下降 ($P<0.01$)；与 OE-SLC7A11 组比较，西黄丸+OE-SLC7A11 组 ROS 荧光强度增强，定量

分析细胞内 ROS 活力水平显著升高 ($P < 0.05$)。结果说明西黄丸含药血清干预 HepG2 24 h 后可引起 ROS 积累。

3.6 西黄丸对 OE-SLC7A11 转染 HepG2 细胞铁沉积及 Fe^{2+} 水平的影响

铁死亡涉及多种分子机制, 包括 SLC7A11/GPX4 通路引起的抗氧化防御失活及转铁蛋白受体

等引起的铁代谢调控, 而 SLC7A11 不直接调节细胞内铁的含量。本研究通过测定细胞内 Fe^{2+} 浓度以探讨西黄丸是否可同时影响了细胞内铁代谢。如图 5 所示, 与对照组相比, 西黄丸含药血清组铁沉积明显增加, Fe^{2+} 含量显著增加 ($P < 0.01$); 与 NC 组相比, OE-SLC7A11 组铁沉积及 Fe^{2+} 积累程度无显著变化。与 OE-SLC7A11 组相比, 西黄丸+OE-



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 OE-SLC7A11 组比较: $\$P < 0.05$ $\$\$P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs NC group; $\$P < 0.05$ $\$\$P < 0.01$ vs OE-SLC7A11 group.

图 5 西黄丸通过 SLC7A11/GPX4 轴诱导 HepG2 细胞铁死亡 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$)

Fig. 5 Xihuang Pill induces ferroptosis in HepG2 cells via SLC7A11/GPX4 axis ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$)

SLC7A11 组表现出铁聚集程度增加, 且 Fe^{2+} 水平显著增加 ($P < 0.05$), 说明西黄丸可能存在调控铁转运的相关机制而促进了铁的积累。

3.7 西黄丸对 OE-SLC7A11 转染 HepG2 细胞 GSH、MDA 水平的影响

SLC7A11 升高, 可致 GSH 合成增多, 导致脂

质过氧化被抑制。如图 5 所示,与对照组相比,西黄丸组 MDA 水平显著上升、GSH 水平下降 ($P < 0.01$);与 NC 组相比,OE-SLC7A11 组 MDA 水平显著下降、GSH 水平显著上升 ($P < 0.01$)。与 OE-SLC7A11 组比较,西黄丸+OE-SLC7A11 组,MDA 水平显著上升、GSH 水平下降 ($P < 0.01$),说明可逆转 SLC7A11 升高而引起的脂质过氧化抑制效应。

3.8 西黄丸对 OE-SLC7A11 转染 HepG2 细胞 SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 水平的影响

为进一步明确西黄丸对 HepG2 细胞铁死亡的诱导效应与 SLC7A11/GPX4 轴有关,本研究检测了 SLC7A11、GPX4 的蛋白及 mRNA 表达水平。如图 5 所示,与对照组相比,西黄丸组 SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$);与 NC 组相比,OE-SLC7A11 组 SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 表达水平显著上升 ($P < 0.01$);与 OE-SLC7A11 组相比,西黄丸+OE-SLC7A11 组铁死亡通路相关 SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 的表达显著下降 ($P < 0.01$),说明西黄丸可调控 SLC7A11/GPX4 通路。

4 讨论

中医药在肿瘤的治疗方面具有独特的优势,中西医结合用以控制症状、预防复发转移及延长生存的作用已成为肝癌治疗的重要手段,国家卫生健康委发布的《原发性肝癌诊疗指南(2024 年版)》,已将中西药联合应用作为肝癌晚期联合用药的推荐方案之一^[13]。西黄丸应用历史悠久,临床已证实其在多种癌症的治疗中具有显著疗效,可单独使用或与常规化疗联合使用,可以增强抗肿瘤作用、降低放疗化疗毒性、缓解肿瘤引起的各种症状,提高患者的生活质量^[14]。晚期原发性肝癌患者应用西黄丸治疗者,与治疗前相比,患者生活质量评分提高,发热、纳差症状改善、疼痛明显缓解^[15]。介入化疗联合西黄丸治疗可改善肝功能指标,抑瘤效果优于单纯使用介入化疗者^[16]。本课题组前期研究结果表明,西黄丸对肝癌具有显著的疗效,高、中、低剂量组对 H22 移植瘤小鼠的肿瘤抑制率达 59.44%、56.55%和 44.74%^[8],并结合细胞实验证实西黄丸具有抑制肿瘤增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用,其作用机制与抑制 STAT3 通路有关^[9]。近年来已有多项研究结果表明 STAT3 的激活可引起铁死亡的抑制^[17],因此本研究基于前期研究结果,聚焦铁死亡途径,探讨西黄丸对肝癌抑制作用的相关机制。

铁死亡是一种细胞死亡级联反应,对抑制肿瘤进展至关重要,其核心机制为抗氧化的失衡、脂质过氧化产物的堆积及铁超载^[18-19]。脂质过氧化产物堆积还可引起线粒体损伤,表现为线粒体嵴减少或消失,线粒体肿胀或线粒体外膜的皱缩、破裂,最终引起细胞死亡^[20]。HepG2 为铁死亡抑制与诱导效应研究的常用细胞株,已有研究表明其本身对铁死亡不敏感,但可因内源性或外源性因素诱导而调控铁死亡发生,其对铁死亡的响应依赖于 GPX4 的活性或过表达,且 P53/SLC7A11/GPX4 信号通路是 HepG2 发生铁死亡的核心机制之一^[21]。因此本研究选用人肝癌 HepG2 细胞株,从铁死亡相关指标 ROS、MDA、GSH、 Fe^{2+} 水平、细胞线粒体损伤及铁死亡核心蛋白 SLC7A11、GPX4 的表达等方面系统评价其对细胞铁死亡的诱导机制。研究结果表明,西黄丸含药血清对 HepG2 增殖具有显著抑制效应,且对 HepG2 增殖的抑制作用具有剂量相关性。线粒体形态不可逆改变及功能障碍是细胞铁死亡的特点之一,通过透射电镜观察细胞形态发现西黄丸含药血清干预 24 h 可引起 HepG2 细胞线粒体肿胀、线粒体嵴结构发生断裂、消失等结构改变,符合铁死亡的线粒体形态学特征。

SLC7A11/GPX4 通路是细胞铁死亡的经典通路,SLC7A11 作为质膜上胱氨酸/谷氨酸反向转运系统 Xc 的关键特异性亚基,发挥着抑制铁死亡的重要作用。SLC7A11 将细胞外胱氨酸导入细胞中以合成 GSH^[22],SLC7A11 的耗竭会触发 GSH 消耗,进而下调 GPX4。GPX4 是特异性还原细胞膜磷脂脂质过氧化物的关键酶,GPX4 下调可引起细胞膜脂质过氧化物无法清除、大量堆积,并导致 Fe^{2+} 依赖性脂质过氧化物沉积,从而损害细胞和亚细胞膜^[23]。本研究通过 SLC7A11 质粒转染 HepG2 细胞,构建了铁死亡通路抑制细胞模型,研究结果证实西黄丸含药血清可显著降低 SLC7A11 质粒转染引起的细胞增殖效应,逆转由于 SLC7A11 过表达而导致的 GSH 合成增多,及 ROS、MDA 水平的降低,同时逆转下游靶基因 GPX4 的蛋白和 mRNA 表达水平。以上结果初步证实西黄丸可通过降低 SLC7A11 表达,降低胞内 GSH 的合成,进而促进 GPX4 的失活和胞内脂质过氧化物堆积,诱导了肝癌细胞铁死亡。研究中发现 SLC7A11 过表达转染后并未降低 HepG2 中 Fe^{2+} 的浓度,与文献报道一致^[24],但西黄丸干预后仍上调了 SLC7A11 过表达后

HepG2 中 Fe^{2+} 的水平,说明西黄丸对铁死亡的诱导效应不是 SLC7A11/GPX4 的单独效应,可能还影响了细胞内铁的转运与代谢等环节。

西黄丸对 HepG2 细胞增殖的抑制作用机制,与其下调 SLC7A11/GPX4 信号轴,诱发肿瘤细胞铁死亡有关,然而其具体的分子调控机制及相关药效物质尚待开展相关实验进一步研究,本课题组后续将深入探讨其相关调控机制,以期阐明西黄丸抗肝癌的现代科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Koshy A. Evolving global etiology of hepatocellular carcinoma (HCC): Insights and trends for 2024 [J]. J Clin Exp Hepatol, 2025, 15(1): 102406.
- [2] Shek D, Read S A, Nagrial A, et al. Immune-checkpoint inhibitors for advanced hepatocellular carcinoma: A synopsis of response rates [J]. Oncologist, 2021, 26(7): 1216-1225.
- [3] Chen X, Yu C H, Kang R, et al. Cellular degradation systems in ferroptosis [J]. Cell Death Differ, 2021, 28(4): 1135-1148.
- [4] 陆娟, 木亚林, 赵旭林, 等. 西黄丸联合 GLF 方案对中晚期食管鳞癌近期及对患者免疫功能影响 [J/OL]. 辽宁中医杂志, 2025, <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.r.20251210.1740.089>.
Lu J, Mu Y L, Zhao X L, et al. The effect of Xihuang Pills combined with GLF regimen on the short-term and immune function of patients with intermediate and advanced esophageal squamous cell carcinoma [J/OL]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2025, <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.r.20251210.1740.089>.
- [5] 卢佳伟, 李金红, 陈光, 等. 西黄丸联合 PP 化疗方案治疗痰瘀互结型非小细胞肺癌患者的效果 [J]. 中国药物应用与监测, 2025, 22(1): 111-115.
Lu J W, Li J H, Chen G, et al. Efficacy of xihuangwan combined with PP regimen in treatment of non-small cell lung cancer with phlegm and stasis interconnection [J]. Chin J Drug Appl Monit, 2025, 22(1): 111-115.
- [6] 贺惠, 陈少强. 西黄丸治疗乳腺癌的作用机制研究进展 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2025, 32(1): 25-31.
He H, Chen S Q. Research progress on the mechanism of action of Xihuang Pill in the treatment of breast cancer [J]. Chin J Clin Oncol Rehabil, 2025, 32(1): 25-31.
- [7] 邵萌, 周太成, 殷志新, 等. 西黄丸的抗肿瘤作用及临床应用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(6): 504-509.
- [8] 刘艳之, 王艳, 刘凯丽, 等. 西黄丸对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(7): 754-761.
Liu Y Z, Wang Y, Liu K L, et al. Inhibition and mechanism of Xihuang Pill on mice bearing hepatoma H22 tumor [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2022, 27(7): 754-761.
- [9] Wang Y, Wang W H, Liu K L, et al. The mechanism of Xihuang Pills' intervention in the tumour immune microenvironment for the treatment of liver cancer based on the STAT3-PDL1 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 331: 118278.
- [10] Jennis M, Kung C P, Basu S, et al. An African-specific polymorphism in the TP53 gene impairs p53 tumor suppressor function in a mouse model [J]. Genes Dev, 2016, 30(8): 918-930.
- [11] Su Y, Zhao B, Zhou L, et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anticancer drugs [J]. Cancer Letters, 2020, 483(28): 127-136.
- [12] 王籍贤, 齐越, 黄培池, 等. 基于 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 信号通路探讨癫痫清含药血清对小胶质细胞铁死亡影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(12): 25-34.
Wang J X, Qi Y, Huang P C, et al. Effect of Dianxianqing (癫痫清) drug-containing serum on microglial ferroptosis based on FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 signaling pathway [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2025, 27(12): 25-34.
- [13] 樊嘉, 王征. 从《原发性肝癌诊疗指南(2024 年版)》更新看我国肝癌综合治疗新进展 [J]. 中国实用外科杂志, 2024, 44(9): 984-987.
Fan J, Wang Z. New advances in comprehensive treatment of liver cancer in China: Insights from the Guideline for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (2024 edition) [J]. Chin J Pract Surg, 2024, 44(9): 984-987.
- [14] 周云娣. 西黄丸辅助治疗晚期原发性肝癌效果观察 [J]. 临床合理用药, 2020, 13(4): 73-75.
Zhou Y D. Observation on the effect of Xihuang Pill in adjuvant treatment of advanced primary liver cancer [J]. Chin J Clin Ration Drug Use, 2020, 13(4): 73-75.
- [15] 李梦宜, 张磊, 王立军, 等. 西黄丸/胶囊辅助放疗和(或)化疗治疗消化道恶性肿瘤有效性和安全性的 Meta 分析 [J]. 中医杂志, 2025, 66(9): 912-919.
Li M Y, Zhang L, Wang L J, et al. A Meta-analysis on the efficacy and safety of Xihuang pill/capsule (西黄丸/胶囊) as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy in the

- treatment of malignant digestive tract tumors [J]. *J Tradit Chin Med*, 2025, 66(9): 912-919.
- [16] 程志强. 西黄丸治疗晚期原发性肝癌 23 例疗效观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(1): 52-54.
- Cheng Z Q. Clinical observation on Xihuang Pill in treating 23 cases of advanced primary hepatic cancer [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2010, 25(1): 52-54.
- [17] Zhou B R, Liu J, Kang R, et al. Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 66: 89-100.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 郭倪君. 谷胱甘肽过氧化物酶 4 去磷酸化修饰介导线粒体 p53 逆行入核促进肝癌细胞诱导性铁死亡的机制研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2020.
- Guo N J. Research on the mechanism of mitochondrial p53 retrograde entry into nucleus mediated by glutathione peroxidase 4 dephosphorylation modification to promote inducible ferroptosis in hepatoma cells [D]. Xiamen: Xiamen University, 2020.
- [22] 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.
- [23] Yang W S, SriRamaratnam R, Welsch M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331.
- [24] Wei X, Huan Y. Valtrate antagonizes malignant phenotypes of lung cancer cells by reducing SLC7A11 [J]. *Human Exp Toxicol*, 2022, 41. doi:10.1177/09603271221124096.

[责任编辑 兰新新]