

槲皮素通过诱导铁死亡抑制 A549 细胞增殖的作用及机制研究

李 畅¹, 王 浩², 贺千羽¹, 郭向宇¹, 姜彤伟^{1*}, 郭 焱^{1*}

1. 长春中医药大学临床医学院, 吉林 长春 130117

2. 集安市医院, 吉林 集安 134200

摘要: **目的** 基于铁死亡信号通路探究槲皮素对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的影响及其作用机制。**方法** CCK-8 法筛选槲皮素作用于 A549 细胞的实验浓度; 平板克隆法检测槲皮素对 A549 细胞集落形成能力的影响; 利用试剂盒检测槲皮素对 A549 细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平的影响; 采用 Western blotting 检测槲皮素对 A549 细胞铁死亡相关蛋白及线粒体凋亡蛋白表达的影响; 采用流式细胞仪检测槲皮素对 A549 细胞内线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)、脂质过氧化物水平及细胞凋亡的影响。联合铁死亡抑制剂 (Ferrostatin-1) 或 ROS 清除剂 *N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC) 检测槲皮素对 A549 细胞内 GSH 水平及铁死亡相关蛋白表达的影响。**结果** 与对照组比较, 槲皮素显著抑制 A549 细胞存活率, 且呈时间和剂量相关性 ($P < 0.01$); 槲皮素呈剂量相关性地抑制 A549 细胞集落形成 ($P < 0.01$), 显著降低 A549 细胞内 GSH 水平 ($P < 0.01$), 上调细胞内 mtROS 及脂质过氧化物水平 ($P < 0.05, 0.01$), 诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$); 显著促进铁死亡相关蛋白 p53 表达 ($P < 0.05, 0.01$), 并抑制谷胱甘肽过氧化物酶 4 (recombinant glutathione peroxidase 4, GPX4) 及胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 蛋白表达 ($P < 0.01$); 显著促进线粒体凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、Caspase-9、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 和 B 淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达 ($P < 0.05, 0.01$), 并抑制抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$)。与槲皮素组比较, 槲皮素+NAC 组与槲皮素+Ferrostatin-1 组均不同程度恢复槲皮素引起的细胞存活率下降 ($P < 0.05, 0.001$), Ferrostatin-1 可显著上调 GPX4 及 SLC7A11 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 并回调 GSH 水平 ($P < 0.05$)。**结论** 槲皮素能够抑制 A549 细胞增殖并诱导铁死亡, 进而导致细胞凋亡, 具有诱导 A549 细胞铁死亡的生物学效应。

关键词: 非小细胞肺癌; 槲皮素; 铁死亡; 细胞增殖; 线粒体活性氧; 脂质过氧化物

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)22-7112-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.22.014

Effect and mechanism of quercetin on inhibiting proliferation of A549 cells via induction of ferroptosis

LI Chang¹, WANG Hao², HE Qian-yu¹, GUO Xiang-yu¹, JIANG Tong-wei¹, GUO Yan¹

1. School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Ji'an Hospital, Ji'an 134200, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of quercetin on proliferation of human non-small cell lung cancer A549 cells based on ferroptosis signaling pathway. **Methods** CCK-8 method was used to screen the experimental concentration of quercetin on A549 cells; The effect of quercetin on colony forming ability of A549 cells was detected by plate cloning method; The effect of quercetin on glutathione (GSH) level in A549 cells was detected by kit; Western blotting was used to detect the effect of quercetin on the expressions of ferroptosis related protein and mitochondrial apoptosis protein in A549 cells; The effects of quercetin on mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), lipid peroxide level and apoptosis in A549 cells were detected by flow cytometry.

收稿日期: 2022-08-14

基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目 (YDZJ202201ZYTS151); 国家自然科学基金国际合作项目 (3191101705); 吉林省科学技术厅 (20210204029YY)

作者简介: 李 畅, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学相关研究。E-mail: lichang970330@163.com

***通信作者:** 姜彤伟, 男, 博士, 教授, 主要从事中西医结合研究。E-mail: tw2008.ok@163.com

郭 焱, 女, 博士, 教授, 主要从事中西医结合研究。E-mail: ccguoyan@163.com

Combined with ferroptosis inhibitor (Ferrostatin-1) or ROS scavenger *N*-acetylcysteine (NAC), the effects of quercetin on GSH level and expressions of ferroptosis related proteins in A549 cells were detected. **Results** Compared with control group, quercetin significantly inhibited the survival rate of A549 cells, with a time-dose correlation ($P < 0.01$). Quercetin inhibited the colony formation of A549 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$), significantly decreased GSH level in A549 cells ($P < 0.01$), up-regulated mtROS and lipid peroxide levels in A549 cells ($P < 0.05, 0.01$), and induced apoptosis ($P < 0.01$); Quercetin significantly promoted the expression of ferroptosis related protein p53 ($P < 0.05, 0.01$), and inhibited the expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and soluble carrier family 7 member 11 (SLC7A11) ($P < 0.01$); Quercetin significantly promoted expressions of mitochondrial apoptosis related proteins such as cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3), Caspase-9, cytochrome c (Cyt C) and B cell lymphoma-2 (Bcl-2) related X protein (Bax) ($P < 0.05, 0.01$), and inhibited the protein expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 ($P < 0.01$). Compared with quercetin group, quercetin + NAC group and quercetin + Ferrostatin-1 group recovered the decrease of cell survival rate caused by quercetin to varying degrees ($P < 0.05, 0.001$), and ferrostatin-1 could significantly up-regulated GPX4 and SLC7A11 protein expressions ($P < 0.05$), and regulated the level of GSH ($P < 0.05$). **Conclusion** Quercetin can inhibit the proliferation of A549 cells and induce ferroptosis, and then lead to cell apoptosis, which has the biological effect of inducing ferroptosis in A549 cells.

Key words: non-small cell lung; quercetin; ferroptosis; cell proliferation; mitochondrial reactive oxygen species; lipid peroxides

肺癌是常见的恶性肿瘤，其发病率和死亡率均居肿瘤首位，5 年生存率不到 20%^[1]。其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占肺癌的 85%^[2]。现有的治疗方法主要是外科手术以及放疗、化疗治疗，但放化疗具有不良反应多、耐受性等问题^[3]。中药因具有毒性较小、不易产生耐受性等优势逐步成为研究重点，中药诱导肿瘤细胞凋亡、抑制增殖是当前寻找有效癌症治疗的一个新的研究领域。

槲皮素是植物中广泛存在的天然黄酮类化合物，是贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 的主要有效成分^[4]，具有止咳、平喘、抗病毒、抗氧化等药理活性^[5]。研究表明，槲皮素对多种肿瘤细胞系具有细胞毒活性^[6]，在内科疾病、骨科疾病、神经系统疾病中具有一定治疗作用^[7]，同时在肺癌中也有良好的治疗作用。现代药理学研究证实槲皮素及其衍生物能够通过调节丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) /磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMP-dependent/activated protein kinase, AMPK) 信号通路抑制细胞增殖，促进人肺癌 A549 细胞凋亡^[8]。表明槲皮素是一种潜在的抗肿瘤药物，对肿瘤细胞的增殖具有抑制作用，但槲皮素对 NSCLC 的干预效果仍需进一步的研究。

2012 年，Dixon 等^[9]首次报道了铁死亡这一新型细胞死亡方式，其特点是细胞内脂质活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增加超过细胞内抗氧化系统的代偿，进而诱导细胞发生死亡。铁死亡在形态、生化、遗传和功能上明显不同于细胞坏死、凋亡和自噬，其与肿瘤的发生、发展、治疗和耐药

等密切相关^[10]。铁是人体内重要的微量元素，过量的铁会催化芬顿反应产生 ROS，从而促进脂质过氧化导致铁死亡，同时铁代谢生物学过程中铁可从各个环节调控铁死亡^[11]。研究报道，铁代谢失调与肺癌的发生发展密切相关，NSCLC 可能通过铁代谢途径发生铁死亡^[12]。同时在肾癌、结直肠癌及乳腺癌等肿瘤研究中已证实调控铁死亡可抑制肿瘤细胞的增殖^[13]。此外，槲皮素具有促进肿瘤细胞铁蛋白积累并诱导肿瘤细胞铁代谢失常的作用，最终引起机体铁稳态失衡^[14]。因此，本研究基于铁死亡通路，以 A549 细胞为研究对象，探究槲皮素对 A549 细胞增殖以及铁死亡的影响，进而探讨槲皮素通过诱导 A549 细胞发生铁死亡生物学效应发挥对肿瘤细胞的杀伤作用，以期为其临床治疗 NSCLC 提供研究基础。

1 材料

1.1 细胞株

A549 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

槲皮素 (质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 C28J11Y116820) 购自上海源叶生物科技有限公司；胎牛血清 (批号 2148389) 购自以色列 BI 公司；DMEM 培养基 (批号 AG29719232)、胰蛋白酶 (批号 2403077) 购自美国 Gibco 公司；PBS 缓冲液 (批号 I30FD0151) 购自上海生工公司；二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 BCCD8942)、*N*-乙酰半胱氨酸 (*N*-acetylcysteine, NAC, 批号 WXBC5687V) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司；BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 092221220118)、CCK-8 细

胞活力试剂盒(批号 031821210930)、FITC 偶联 Annexin-V 凋亡试剂盒(批号 092120210513)购自上海碧云天公司; MitoSox™ Red 线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)检测探针(批号 2286876)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(批号 20200616)购自南京建成生物工程研究所; ECL 超敏化学发光液(批号 01621098)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4(recombinant glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体(批号 334286)、胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗体(批号 334063)购自上海 Abmart 生物医药公司; β -actin 抗体(批号 ab8227)、p53 抗体(批号 GR146370-9)、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)抗体(批号 GR247561-2)、B 淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 GR196071-15)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 GR151406-19)购自英国 Abcam 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)抗体(批号 00101520)、Caspase-9 抗体(批号 00097424)购自美国 Proteintech 生物公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(批号 214800915)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 219761108)购自北京中衫金桥生物技术公司; Liperfluo 细胞脂质过氧化物检测探针(批号 TM607)购自日本同仁化学公司; 铁死亡特异性抑制剂(Ferrostatin-1, 批号 148475)购自上海陶素药业有限公司。

1.3 仪器

FORMA3111 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BD Accuri C6™ 流式细胞仪(美国 BD 公司); Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 1645050 型蛋白质电泳仪、Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems 电泳槽、Trans-Blot® SD System 半干转仪(美国 Bio-Rad 公司); Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 槲皮素母液的配制

精密称取槲皮素 10 mg 溶于 3.3 mL DMSO 中, 配成浓度为 10 mmol/L 的槲皮素母液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 使用时用培养基稀释。

2.2 细胞培养

A549 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力

取对数生长期的 A549 细胞, 胰蛋白酶消化后以 5×10^3 /孔接种到 96 孔板中。待细胞贴壁后, 弃去培养基, 分别加入含槲皮素终浓度为 0、50、100、150、200、250、300 μ mol/L 的培养基, 于培养箱中培养 24、48、72 h, 然后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 于培养箱中继续孵育 30 min, 采用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度(A)值, 以培养基为空白孔调零, 计算细胞存活率, 并计算槲皮素对 A549 细胞的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀), 根据 IC₅₀ 值设置后续实验的给药浓度, 设置低、中、高 3 个剂量。

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

2.4 细胞克隆形成实验

取对数生长期的 A549 细胞, 以 2×10^3 个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h。设置对照组(不加药物)和槲皮素低、中、高剂量(100、150、200 μ mol/L)组, 每组设置 3 个复孔, 培养 14 d, 直至形成肉眼可见的细胞克隆。弃去细胞培养液, PBS 清洗 2 次, 结晶紫染色 10 min, 弃掉染液, PBS 清洗 2 次, 拍照。加入 DMSO 溶解结晶紫, 采用酶标仪测定 590 nm 处各孔 A 值。

2.5 细胞内 GSH 水平测定

取对数生长期的 A549 细胞, 以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。设置对照组(不加药物)和槲皮素低、中、高剂量(100、150、200 μ mol/L)组, 加入含相应药物的培养基处理 24 h, 收集细胞, 按试剂盒说明书测定 GSH 水平。

2.6 Western blotting 检测铁死亡相关蛋白表达和线粒体凋亡蛋白表达的影响

按“2.5”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定上清液中的蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂牛奶, 室温封闭 3 h, 加入相应一抗孵育过夜; TBST 充分洗膜后, 加入二抗, 室温孵育 40 min, TBST 充分洗膜, 加入显影液曝光, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.7 细胞内 mtROS 水平测定

按“2.5”项下方法进行分组和给药,收集细胞, PBS 洗涤 3 次,加入 1 mL MitoSox (2 $\mu\text{mol/L}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次,采用流式细胞仪进行分析。

2.8 细胞内脂质过氧化物水平测定

按“2.5”项下方法进行分组和给药,收集细胞, PBS 洗涤 1 次,用 Liperfluor 荧光探针染液 (10 $\mu\text{mol/L}$)重悬细胞沉淀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,用 PBS 将细胞重悬后,采用流式细胞仪进行分析。

2.9 细胞凋亡率检测

按“2.5”项下方法进行分组和给药,收集细胞, 1000 r/min 离心 3 min, PBS 洗涤 3 次,加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V/FITC 混匀,再加入碘化丙啶 (PI) 染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.10 Ferrostatin-1 及 NAC 与槲皮素联合处理对 A549 细胞存活率的影响

取对数生长期的 A549 细胞,胰蛋白酶消化后以 5×10^3 /孔接种到 96 孔板中。设置对照组 (不含药物)、槲皮素 (200 $\mu\text{mol/L}$) 组、Ferrostatin-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组、槲皮素 + Ferrostatin-1 组、NAC (5 mmol/L) 组和槲皮素 + NAC 组。待细胞贴壁后,对照组仅加入 DMEM 培养基,各给药组分别加入含相应药物的等体积培养基,每组设置 3 个复孔,于培养箱中培养 24 h,按“2.3”项下方法测定细胞存活率。

2.11 Ferrostatin-1 与槲皮素联合处理对 A549 细胞铁死亡相关蛋白表达及 GSH 水平的影响

取对数生长期的 A549 细胞,以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜。设置对照组 (不含药物)、槲皮素 (200 $\mu\text{mol/L}$) 组、Ferrostatin-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组和槲皮素 + Ferrostatin-1 组,待细胞贴壁后,弃去培养基,分别加入含相

应药物的培养基,于培养箱中培养 24 h。收集细胞,按“2.6”项下方法测定铁死亡相关蛋白表达,按试剂盒说明书测定 GSH 水平。

2.12 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.04 软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

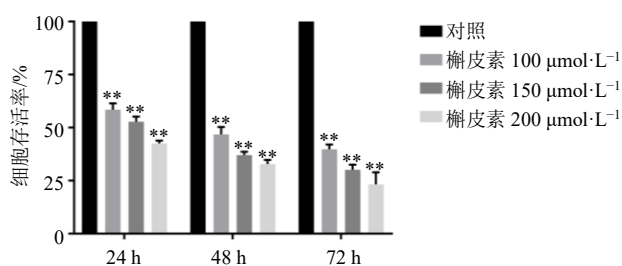
3 结果

3.1 槲皮素对 A549 细胞活力的影响

为检测槲皮素对 A549 细胞活力的影响并确定药物作用浓度,采用不同浓度槲皮素分别处理细胞 24、48、72 h,其 IC_{50} 分别为 160、77.47、63.58 $\mu\text{mol/L}$ 。如图 1 所示,与对照组比较,槲皮素 (100、150、200 $\mu\text{mol/L}$) 组在 24、48、72 h 时的细胞存活率均明显降低 ($P < 0.01$),且呈时间和剂量相关性。从 48 h 开始,与对照组比较,给药组细胞的增殖活力受到明显抑制,由于作用 48、72 h 细胞死亡较多,因此选择药物作用 24 h 作为后续实验的药物最佳作用时间。参考以上结果,确定 24 h 为槲皮素的作用时间,100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 为槲皮素的作用剂量。

3.2 槲皮素对 A549 细胞克隆形成能力的影响

如图 2 所示,与对照组比较,随着槲皮素组浓



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures

图 1 槲皮素对 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of quercetin on survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

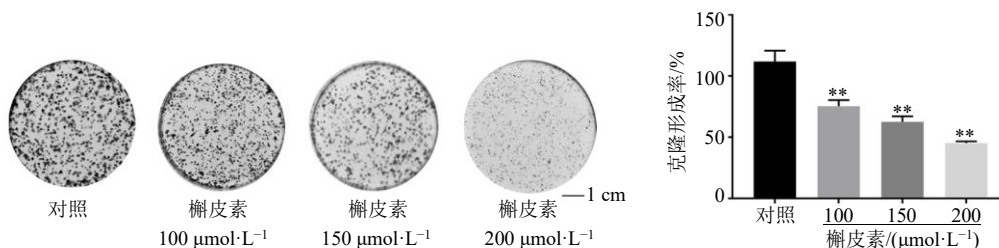


图 2 槲皮素对 A549 细胞克隆形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effect of quercetin on colony formation ability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

度升高, 细胞克隆形成数均显著降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性, 表明槲皮素能够抑制 A549 细胞集落形成能力, 即抑制 A549 细胞增殖。

3.3 槲皮素对 A549 细胞内 GSH 水平的影响

铁死亡的发生伴随着 GSH 水平下降。如图 3 所示, 与对照组比较, 各剂量的槲皮素组细胞内 GSH 水平均显著降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。

3.4 槲皮素对 A549 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 各剂量的槲皮素组细胞内 p53 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), GPX4、SLC7A11 蛋白表达水平均明显下降

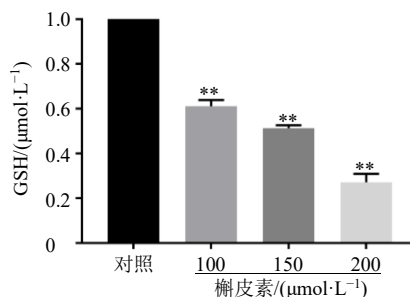


图 3 槲皮素对 A549 细胞内 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of quercetin on GSH level of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

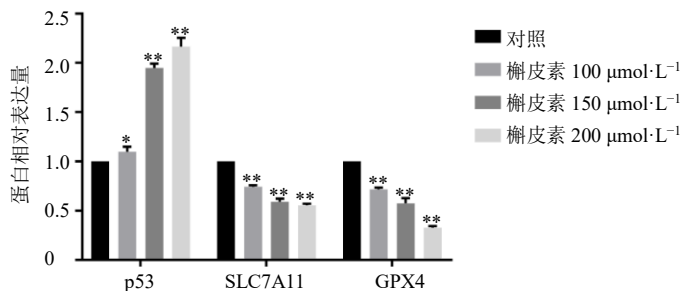
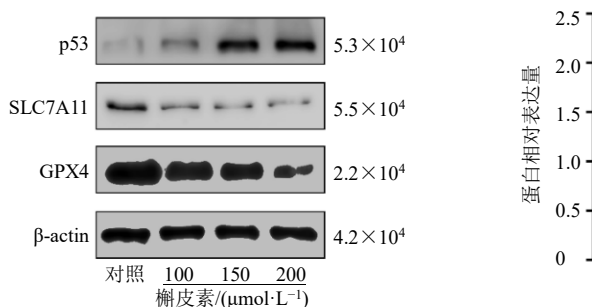


图 4 槲皮素对 A549 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of quercetin on ferroptosis related protein expressions in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。p53、SLC7A11 及 GPX4 为铁死亡相关蛋白, 表明槲皮素可调控铁死亡通路相关蛋白表达从而激活铁死亡。

3.5 槲皮素对 A549 细胞内 mtROS 水平的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 各剂量的槲皮素组细胞内 mtROS 荧光强度显著增强 ($P < 0.01$), 且

呈剂量相关性, 表明槲皮素能够激活细胞内 mtROS 的产生。

3.6 槲皮素对 A549 细胞内脂质过氧化物水平的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 150、200 μmol/L 槲皮素组细胞内 Liperflu 脂质过氧化物荧光强度显著增强 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性, 表明

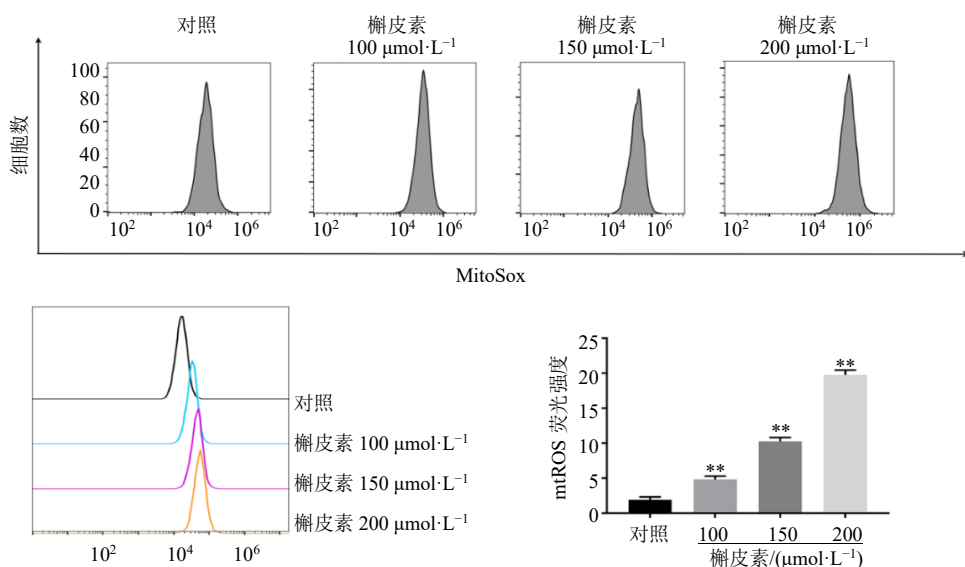


图 5 槲皮素对 A549 细胞内 mtROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of quercetin on mtROS level in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

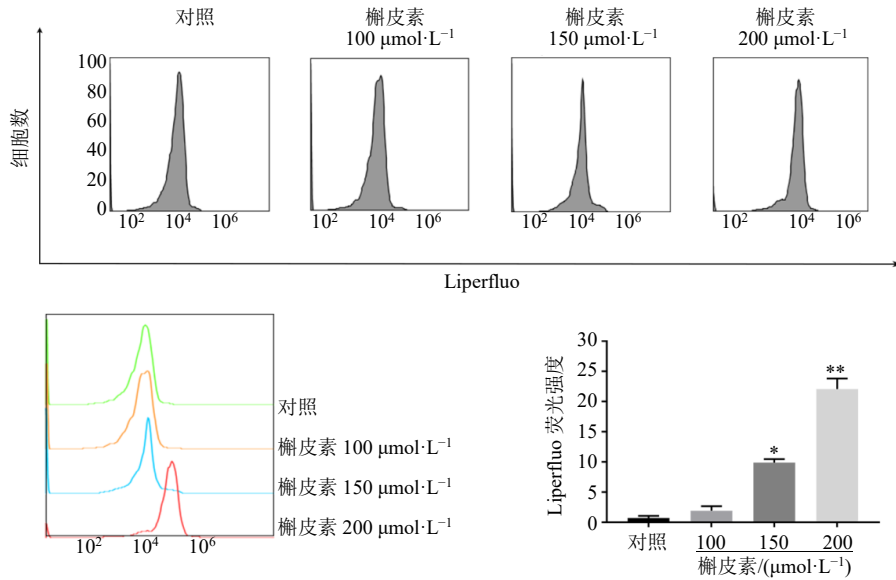


图 6 槲皮素对 A549 细胞内脂质过氧化物水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of quercetin on lipid peroxide levels in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

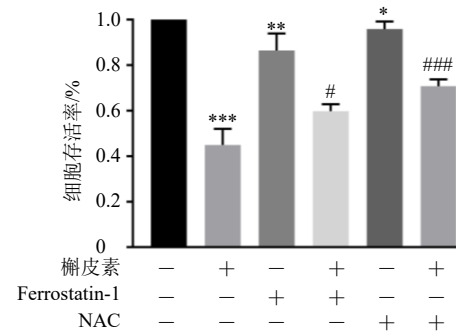
槲皮素能够诱导细胞发生脂质过氧化反应。

3.7 Ferrostatin-1 及 NAC 与槲皮素联合处理对 A549 细胞存活率的影响

分别联合 Ferrostatin-1 及 NAC 处理细胞，观察 200 μmol/L 槲皮素处理下各抑制剂对槲皮素引起的细胞活力下降恢复效果。如图 7 所示，不同小分子抑制剂对槲皮素所致的细胞活力下降均有恢复作用 ($P < 0.05, 0.001$)，进一步说明槲皮素诱导 A549 细胞的死亡方式为铁死亡。

3.8 Ferrostatin-1 与槲皮素联合处理对 A549 细胞铁死亡相关蛋白表达及 GSH 水平的影响

如图 8-A 所示，与槲皮素组比较，Ferrostatin-1 显著上调槲皮素诱导的 SLC7A11 与 GPX4 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。如图 8-B 所示，与槲皮素



与槲皮素组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$, 图 8 同
$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs quercetin group, same as fig. 8

图 7 槲皮素与不同小分子抑制剂联合处理对 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of quercetin combined with different small molecule inhibitors on survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

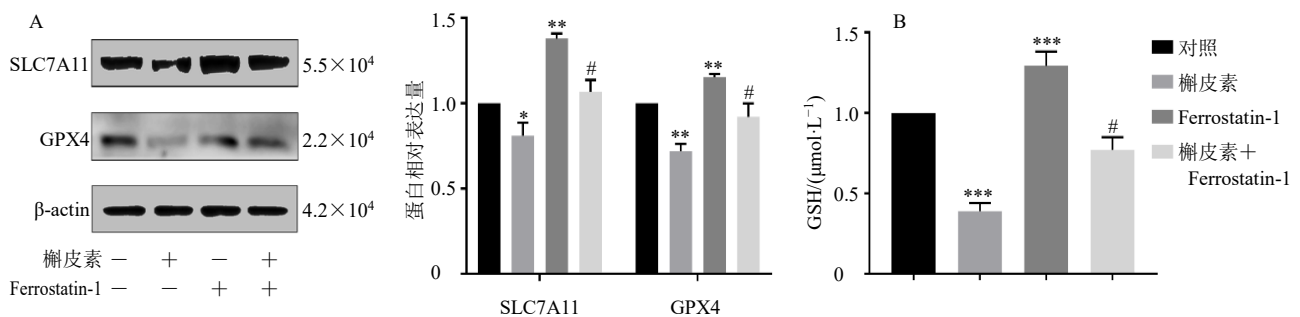


图 8 Ferrostatin-1 与槲皮素联合处理对 A549 细胞铁死亡相关蛋白表达 (A) 及 GSH 水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Ferrostatin-1 combined with quercetin on ferroptosis related protein expressions (A) and GSH level (B) in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组比较, Ferrostatin-1 显著回调槲皮素诱导的细胞内 GSH 水平降低 ($P < 0.05$)。

3.9 槲皮素对 A549 细胞凋亡及线粒体凋亡蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 槲皮素组细胞凋

亡率明显升高 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。如图 10 所示, 与对照组比较, 槲皮素组 Caspase-9、Caspase-3、Bax 和 Cyt C 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明槲皮素可诱导 A549 细胞凋亡。

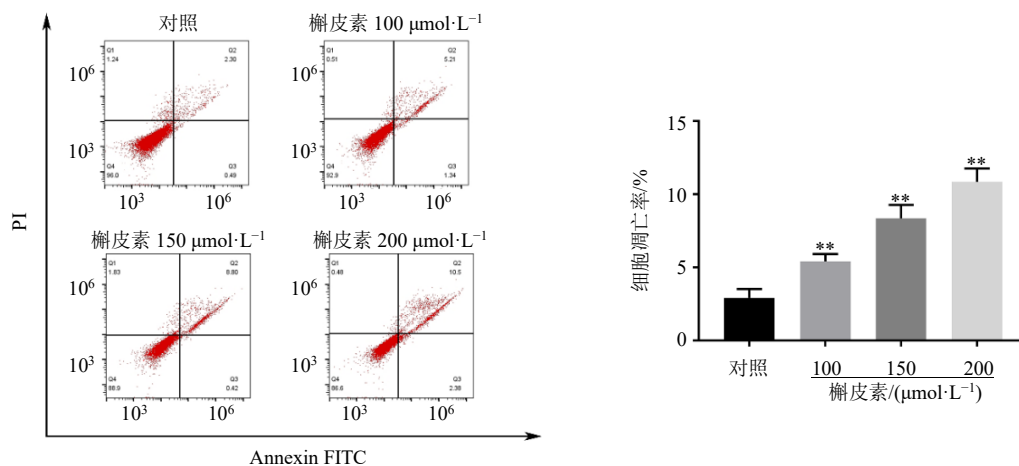


图 9 槲皮素对 A549 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of quercetin on apoptosis of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

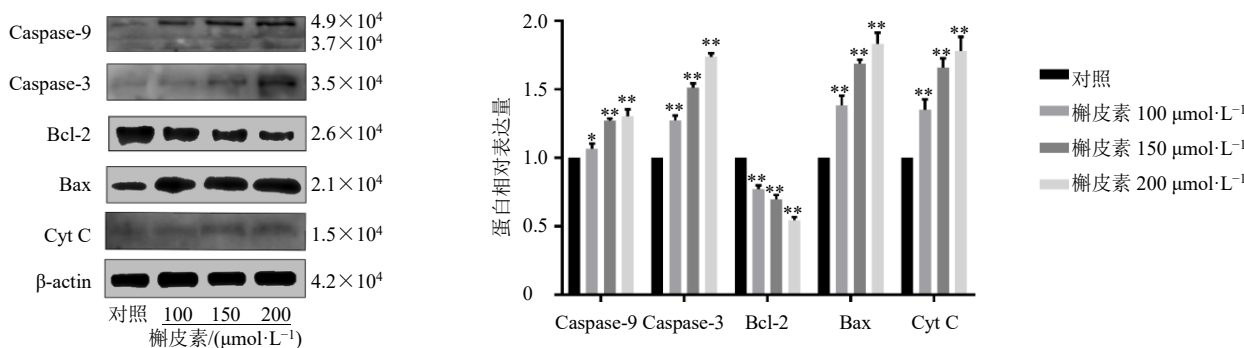


图 10 槲皮素对 A549 细胞线粒体凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of quercetin on protein expressions of mitochondrial apoptosis in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

近 30 年来, 肺癌是我国最常见且发生率增长最快的恶性肿瘤。癌细胞侵袭转移能力很强, 这是制约肺癌手术后生存率提高的主要原因^[15]。本研究评估了槲皮素对 A549 细胞铁死亡的作用, 并探讨了铁死亡被诱导后槲皮素对 A549 细胞增殖的影响。

近年研究发现, 槲皮素具有广谱抗肿瘤作用, 其抗肿瘤机制主要集中在诱导自噬、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡等方面, 并对乳腺癌、结肠癌有较好的抑制作用^[16-18]。本研究结果显示, 经槲皮素处理后, A549 细胞存活率显著降低, 且呈剂量相关性, 同时细胞克隆形成能力下降亦呈剂量相关性, 以上

结果表明槲皮素可抑制 A549 细胞增殖。

铁死亡发生时主要表现为线粒体缩小、膜致密增厚、SLC7A11 与 GPX4 蛋白活性降低、GSH 含量消耗和 mtROS 过量积累造成细胞膜上脂质过氧化物升高^[19]。本研究发现, 经槲皮素处理后, A549 细胞中 GSH 水平降低, mtROS 与脂质过氧化物水平升高, 且呈剂量相关性, 提示槲皮素可诱导 A549 细胞发生铁死亡。

p53 蛋白在调控细胞铁死亡方面发挥着重要的作用^[20], p53 蛋白可通过抑制 SLC7A11 蛋白表达, 从而抑制 GSH 活性, 降低 GPX4 蛋白的表达并促进铁死亡^[21], GPX4 失活导致致命性的代谢失衡是

细胞内铁死亡的执行者^[22]。研究发现,槲皮素可诱导 p53 依赖性癌细胞铁死亡,并与肺癌的发生及发展密切相关^[23]。本研究发现,经槲皮素处理后,A549 细胞中 p53 蛋白表达水平升高,SLC7A11 以及 GPX4 蛋白表达水平降低,且呈剂量相关性,提示槲皮素通过抑制 p53/SLC7A11/GPX4 通路,诱导 A549 细胞铁死亡。为进一步探讨铁死亡通路是否影响槲皮素对 A549 细胞的抑制作用,本研究首先对 A549 细胞进行槲皮素预处理,然后联合铁死亡特异性抑制剂 Ferrostatin-1 和 ROS 清除剂 NAC 处理细胞。Ferrostatin-1 作为一种亲脂性自由基捕获抗氧化剂,可以预防铁死亡。研究报道,在肝癌细胞中,Ferrostatin-1 与 NAC 可阻止二氢青蒿素诱导的肝癌细胞死亡^[24]。结果显示,与单独使用槲皮素组相比,槲皮素+Ferrostatin-1 组、槲皮素+NAC 组细胞活力均有恢复,提示铁死亡可能影响槲皮素抑制 A549 细胞增殖。进一步探讨铁死亡特异性抑制剂 Ferrostatin-1 对槲皮素诱导的 A549 细胞内 GSH 水平、SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达恢复的影响。结果显示,Ferrostatin-1 可恢复槲皮素导致的 GSH 水平下降以及 SLC7A11、GPX4 蛋白表达下调。

另有研究表明,槲皮素可抑制 A549 细胞增殖并诱导其凋亡^[25]。结果显示,槲皮素可诱导 A549 细胞凋亡。线粒体形态与铁死亡进展存在重要的联系,Cyt C 表达于线粒体内膜,可作为线粒体损伤的标志物。当线粒体发生损伤时,Cyt C 释放至胞质触发 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[26]。本研究发现经槲皮素处理后,Cyt C、Caspase-3、Caspase-9 及 Bax 蛋白表达均显著升高,Bcl-2 蛋白表达显著降低。提示槲皮素可显著诱导 A549 细胞凋亡并调节线粒体凋亡蛋白表达,进一步说明槲皮素激活肺癌细胞铁死亡过程中有线粒体凋亡途径的参与。

综上,本研究发现,槲皮素对 A549 细胞具有增殖抑制作用,可能不仅局限于诱导细胞凋亡,铁死亡在槲皮素抗肺癌作用机制中也发挥着重要作用。但铁死亡与细胞凋亡在共同抑制肺癌细胞活性中是否存在相互作用及联系仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] Malyala V, Paudel K R, Shukla S D, et al. Recent advances in experimental animal models of lung cancer [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12(7): 567-570.

[3] Zappa C, Mousa S A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2016, 5(3): 288-300.

[4] 刘妍如,唐志书,白宏博,等.贯叶连翘不同部位黄酮类成分差异与抗炎活性相关性分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(21): 4465-4470.

[5] Granato M, Rizzello C, Gilardini Montani M S, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 41: 124-136.

[6] Maleki Dana P, Sadoughi F, Asemi Z, et al. Anti-cancer properties of quercetin in osteosarcoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 349.

[7] 党树伟,李国东,刘明.槲皮素逆转肿瘤多药耐药机制的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(10): 802-807.

[8] 贾静,刘增娟,朱臻宇,等.槲皮素抗阿霉素诱导心肌毒性的网络多靶标研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(18): 4364-4371.

[9] 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.

[10] 徐畅,黄楠,孙奋勇.铁死亡在肿瘤中的研究进展 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2021, 42(3): 432-440.

[11] 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.

[12] Toyokuni S, Ito F, Yamashita K, et al. Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 610-626.

[13] 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.

[14] Cheng I F, Breen K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex [J]. *Biomaterials*, 2000, 13(1): 77-83.

[15] Wei W Q, Zeng H M, Zheng R S, et al. Cancer registration in China and its role in cancer prevention and control [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(7): e342-e349.

[16] Jia L J, Huang S, Yin X R, et al. Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt-mTOR pathway mediated autophagy induction [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 123-130.

- [17] Pang B, Xu X G, Lu Y, *et al.* Prediction of new targets and mechanisms for quercetin in the treatment of pancreatic cancer, colon cancer, and rectal cancer [J]. *Food Funct*, 2019, 10(9): 5339-5349.
- [18] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素磺酸化衍生物合成及其体内外抗肿瘤研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(11): 1945-1950.
- [19] 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.
- [20] Jiang L, Kon N, Li T Y, *et al.* Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.
- [21] Chang L C, Chiang S K, Chen S E, *et al.* Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis [J]. *Cancer Lett*, 2018, 416: 124-137.
- [22] Seibt T M, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 144-152.
- [23] Chen K C, Hsu W H, Ho J Y, *et al.* Flavonoids luteolin and quercetin inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(3): 1180-1191.
- [24] 李艳纯, 周怡, 王鑫, 等. 二氢青蒿素通过诱导铁死亡抑制肝癌细胞生长 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(12): 1361-1366.
- [25] Zheng S Y, Li Y, Jiang D, *et al.* Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549 [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3): 822-826.
- [26] Lv R, Xu X, Luo Z, *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) inhibits the overexpression of MCP-1 and attenuates microglial activation in the hippocampus of a pilocarpine-induced status epilepticus rat model [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(1): 39-45.

[责任编辑 李亚楠]