

基于 PERK/Nrf2 信号通路研究山豆根提取物诱导鼻咽癌细胞铁死亡作用机制

丁虹¹, 吴紫陆^{1*}, 蔡纪堂²

1. 河南中医药大学第二临床医学院, 河南 郑州 450002

2. 河南省中医院, 河南 郑州 450002

摘要: 目的 基于蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) /核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 通路探究山豆根提取物 (*Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract, TSRE) 诱导鼻咽癌细胞铁死亡作用机制。方法 为研究 TSRE 对鼻咽癌 CNE1 细胞的抑制作用, 设置对照组和 TSRE 低、中、高剂量 (100、200、400 mg/L) 组; 为研究铁死亡在 TSRE 致 CNE1 细胞增殖抑制中的作用以及 PERK/Nrf2 信号通路对铁死亡的影响, TSRE 处理过程中分别用铁死亡抑制剂 Fer-1、PERK 抑制剂 GSK2606414、Nrf2 siRNA 进行干预。MTT 法检测细胞活性; 流式细胞术检测细胞周期; 荧光探针检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和脂质过氧化水平; 比色法检测铁离子和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平; Western blotting 检测溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、p-PERK、Nrf2 和血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 蛋白表达; 免疫荧光检测 p-PERK 表达和 Nrf2 入核情况。结果 TSRE 组细胞存活率以及 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), G₂/M 期细胞比例显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), Fe²⁺、ROS 和脂质过氧化水平升高 ($P < 0.01$), GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 TSRE 组比较, Fer-1 干预缓解了 TSRE 诱导的细胞存活率降低 ($P < 0.01$), 降低 CNE1 细胞中 Fe²⁺、ROS 及脂质过氧化水平 ($P < 0.01$), 提高细胞中 GSH 水平 ($P < 0.01$)。机制研究表明, TSRE 诱导 Nrf2 表达水平的升高并促进 Nrf2 入核 ($P < 0.01$); 与 NC siRNA 组比较, Nrf2 siRNA 能抑制 TSRE 引起的细胞脂质过氧化和 Fe²⁺ 水平升高和 GSH 水平降低 ($P < 0.01$)。进一步研究发现, TSRE 组细胞中的 p-PERK 蛋白表达水平较对照组明显升高 ($P < 0.01$); PERK 抑制剂 GSK2606414 减弱了 TSRE 诱导的 Nrf2 信号活化 ($P < 0.01$)。结论 TSRE 诱导的鼻咽癌细胞铁死亡可能与其激活 PERK/Nrf2 信号通路有关。

关键词: 山豆根提取物; 鼻咽癌细胞; 铁死亡; 蛋白激酶 R 样内质网激酶; 核因子 E2 相关因子 2; 苦参碱; 氧化苦参碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)08-2471-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.014

Mechanism of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on iron death of nasopharyngeal carcinoma cells based on PERK/Nrf2 signaling pathway

DING Hong¹, WU Zi-lu¹, CAI Ji-tang²

1. Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450002, China

2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, 450002, China

Abstract: Objective To explore the effect of Shandougen (*Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*) extract (TSRE) on iron death of nasopharyngeal carcinoma cells based on protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) pathway. **Methods** In order to study the inhibitory effect of TSRE on nasopharyngeal carcinoma CNE1 cells, control group, low-, medium- and high-dose (100, 200, 400 mg/L) TSRE groups were set up. In order to study the role of iron death in proliferation inhibition of CNE1 cells induced by TSRE and influence of PERK/Nrf2 signaling pathway on iron death, iron death inhibitor Fer-1, PERK inhibitor GSK2606414 and Nrf2 siRNA were used to intervene in TSRE treatment. Cell activity was detected by MTT assay; Cell cycle was detected by flow cytometry. The levels of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation were detected by fluorescence probe. The levels of iron ion and glutathione (GSH) were detected by colorimetry. Western blotting was used to detect the protein

收稿日期: 2022-11-14

基金项目: 河南中医药大学 2021 年度研究生科研能力创新提升计划 (2021KYCX025); 河南省中医药科学研究专项课题 (2022ZY1057)

作者简介: 丁虹, 博士, 副主任医师, 副教授, 从事中医药防治耳鼻喉咽喉疾病研究。E-mail: dinghong1995@126.com

*通信作者: 吴紫陆, 硕士, 住院医师, 从事中医药防治耳鼻喉咽喉疾病研究。E-mail: drwuzilu@163.com

expressions of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4), p-PERK, Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1). Immunofluorescence was used to detect the expression of p-PERK and nucleation of Nrf2. **Results** In TSRE group, cell survival rate and expression levels of SLC7A11 and GPX4 protein were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), proportion of G₀/G₁ and S phase cells were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), proportion of G₂/M phase cells was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), Fe²⁺, ROS and lipid peroxidation levels were increased ($P < 0.01$), while GSH level was decreased ($P < 0.01$). Compared with TSRE group, the intervention of Fer-1 alleviated the decrease of cell survival rate induced by TSRE ($P < 0.01$), decreased the levels of Fe²⁺, ROS and lipid peroxidation in CNE1 cells ($P < 0.01$) and increased the level of GSH in cells ($P < 0.01$). The mechanism study showed that TSRE induced the increase of Nrf2 expression level and promoted Nrf2 nucleation ($P < 0.01$); Compared with NC siRNA group, Nrf2 siRNA could inhibit the increase of lipid peroxidation, Fe²⁺ levels and the decrease of GSH level induced by TSRE ($P < 0.01$). Further study showed that the expression level of p-PERK protein in TSRE group was significantly higher than that in control group ($P < 0.01$), PERK inhibitor GSK2606414 weakened the activation of Nrf2 signal induced by TSRE ($P < 0.01$). **Conclusion** TSRE-induced iron death in nasopharyngeal carcinoma cells may be related to its activation of PERK/Nrf2 signaling pathway.

Key words: *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract; nasopharyngeal carcinoma cell; ferroptosis; protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; nuclear factor erythroid-2-related factor 2; matrine; oxymatrine

鼻咽癌是我国临床上常见的高发肿瘤之一。鼻咽癌发生于各年龄段且 5 年生存率仅有 43.8%^[1]。临床治疗鼻咽癌首选放射疗法,但其带来的内分泌疾病、听力障碍、牙齿问题、终生口干和继发性肿瘤等后遗症不容忽视^[2]。因此,需要寻找鼻咽癌的新型治疗药物及靶标。中医药治疗鼻咽癌在各个阶段的临床综合疗法中均占有重要地位^[3-4],且临床疗效已得到广泛验证,尤其对放疗增敏和放疗后后遗症疗效颇佳^[5]。山豆根是豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎^[6],性味苦寒、有小毒,归肺、胃经,具有清热解毒、消肿利咽的功效,对火毒蕴结之咽喉肿痛、乳蛾喉痹、口舌生疮及牙龈肿痛均有良效。现代药理学研究发现,山豆根中的主要成分包含黄酮类、生物碱和多糖类,具有调节免疫、抗炎抗氧化、抗肝损伤和抗神经系统损伤的药理活性^[7]。近年来,山豆根提取物的抗肿瘤效应受到越来越多的关注^[8-9],但山豆根提取物对鼻咽癌细胞的抑制作用和其作用机制尚不清楚。

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式,呈铁离子依赖性。铁死亡的主要特征为细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高、谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量降低和脂质过氧化水平增加等^[10]。蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)/核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)是调控铁死亡的重要信号通路^[11]。研究发现,山豆根提取物能够激活细胞中 Nrf2 及其下游蛋白血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达^[12]。因此,本研究旨在探究山豆根提取物对

人源鼻咽癌细胞铁死亡的影响,并从 PERK/Nrf2 途径探讨山豆根提取物诱导人鼻咽癌 CNE1 细胞铁死亡的潜在作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

CNE1 细胞[编号 ZK0022(XR)]、人鼻咽上皮 NP69 细胞[编号 ZK0584(XR)]由河南省中西医结合肿瘤医院提供。

1.2 药材

山豆根由河南省中医院中药房提供,经河南省中医院药剂科焦伟杰副主任药师鉴定为豆科植物越南槐 *S. tonkinensis* Gagnep. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

胎牛血清(批号 MG07061)购自乌拉圭 Lonsera 公司;二甲基亚砷(批号 710N0313)购自北京 Solarbio 公司;碘化丙啶(PI,批号 BS109-25、BS147-10)购自 Biosharp 公司;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号 ab211091)、GSH ELISA 试剂盒(批号 ab138881)、ROS 检测试剂盒(批号 ab113851)、qRT-PCR 试剂盒(批号 ab289834)购自上海艾博抗贸易有限公司;Nrf2 siRNA(批号 sc-37030)购自美国 Santa Cruz 公司;铁含量检测试剂盒、凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK、坏死抑制剂 Necrostatin-1、自噬抑制剂 3-MA、铁死亡抑制剂 Fer-1、N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、PERK 抑制剂 GSK2606414(批号分别为 MAK025、V116、N9037、189490、SML0583、A7250、516535)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Nrf2 抗体、HO-1 抗体、p-PERK 抗体、 β -actin 抗体、溶质载体家族 7 成

员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号分别为 12721T、86806S、3179S、4970T、12691、59735) 购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 A0277)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 A0286) 购自上海碧云天生物技术有限公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司 (批号 11668500); C11-BODIPY 荧光探针 (批号 D4981)、反转录试剂盒 (批号 K1622) 购自美国 Thermo 公司。

1.4 仪器

RCO-3000-5 型细胞培养箱 (美国 REVCO 公司); TK-218 型超高速离心机、流式细胞仪 (美国 Beckman 公司); Spectra MaxM3 型酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); BX41 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 蛋白质电泳与转膜装置 (美国 Bio-Rio 公司); SilverUVIpro 凝胶数字成像分析仪 (英国 UVItec 公司)。

2 方法

2.1 山豆根提取物的制备

称取 80 g 山豆根, 粉碎过筛, 分别以 10、8、6 倍量的 90%乙醇煎煮 3 次, 每次 1 h, 滤过后, 合并 3 次药液, 回收乙醇并浓缩至 3.75 g/mL。采用高效液相色谱法测定山豆根提取物中苦参碱质量浓度为 (10.86 ± 0.88) mg/mL, 氧化苦参碱质量浓度为 (27.00 ± 2.69) mg/mL。

2.2 细胞培养、分组与给药

CNE1 和 NP69 细胞用含 10%胎牛血清、1%青-链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 取 3~5 代的对数生长期细胞进行实验。

2.2.1 山豆根提取物对 CNE1 细胞的影响 设置对照组 (不含药物) 和山豆根提取物低、中、高剂量 (100、200、400 mg/L) 组。

2.2.2 不同抑制剂对细胞活性的影响 分别在 20 μmol/L 的 Z-VAD-FMK (凋亡抑制剂)、50 μmol/L 的 Necrostatin-1 (坏死抑制剂)、2 mmol/L 的 3-MA (自噬抑制剂) 和 10 μmol/L 的 Fer-1 (铁死亡抑制剂) 预处理 1 h, 再加入 400 mg/L 山豆根提取物处理 24 h, 另设置不含药物的对照组。

2.2.3 铁死亡在山豆根提取物致鼻咽癌细胞增殖抑制中的作用 设置对照组、山豆根提取物组 (400 mg/L)、Fer-1 组 (10 μmol/L) 和 Fer-1+山豆根提取物组。

2.2.4 NAC 对山豆根提取物诱导细胞脂质过氧化损伤的影响 设置对照组、山豆根提取物组、NAC 组和 NAC+山豆根提取物组。1 mmol/L NAC 预处理 1 h, 之后加入 400 mg/L 山豆根提取物处理 24 h。

2.2.5 Nrf2 在山豆根提取物致细胞铁死亡中的作用 设置 NC siRNA、Nrf2 siRNA、山豆根提取物+NC siRNA、山豆根提取物+Nrf2 siRNA 组。细胞按照转染试剂说明书的要求进行 Nrf2 siRNA 转染, 转染 48 h 后用 400 mg/L 山豆根提取物处理 24 h。

2.2.6 PERK 对 Nrf2 信号的影响 设置对照组、山豆根提取物组、GSK2606414 组和 GSK2606414+山豆根提取物组。细胞用 1 μmol/L 的 GSK2606414 预处理 1 h, 之后加入 400 mg/L 山豆根提取物继续处理 24 h。

2.3 MTT 法检测细胞活性

将细胞以 5×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 按“2.2.1”项下方法处理 12、24、48 h, 弃去上清, 加入 MTT 溶液, 孵育 4 h 后弃上清, 加入二甲亚砜, 摇床低速震荡 10 min, 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值。

将细胞以 5×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 按“2.2.2”项下方法处理, 吸去上清, 加入 MTT 溶液, 用酶标仪检测 490 nm 处的 *A* 值。

2.4 细胞周期检测

取对数生长期的 CNE1 细胞, 按“2.2”项下方法处理后, 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液并使用无菌 PBS 洗涤, 使用 70%的预冷乙醇固定单细胞悬液 (4 °C、30 min), 无菌 PBS 洗涤后染色; 加入 100 μL RNaseA (20 μg/mL), 37 °C 孵育 30 min; 加入 400 μL PI, 混合后 4 °C 静置 30 min, 使用流式细胞仪检测, 记录 488 nm 处红色荧光。

2.5 脂质过氧化水平的检测

取对数期生长期的 CNE1 细胞, 以 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中进行培养, 待细胞贴壁后, 按“2.2”项下方法处理后, 每孔加入 C11-BODIPY 荧光探针 (10 μmol/L) 孵育 30 min, 收集细胞, 无菌 PBS 洗涤 2 遍, 荧光显微镜拍照, Image J 软件对荧光强度进行分析。

2.6 GSH 水平的检测

取对数生长期的 CNE1 细胞, 按“2.2”项下方法处理后, 按照试剂盒说明书测定 GSH 水平。

2.7 铁离子水平的检测

取对数期生长期的 CNE1 细胞, 以 1×10^5 个/mL

接种于 12 孔板中,待细胞贴壁后,按“2.2”项下方法处理,按照试剂盒说明书测定细胞中的铁离子水平。

2.8 ROS 水平的检测

取对数生长期的 CNE1 细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中进行培养,待细胞贴壁后,ROS 清除剂组预孵育 2 h,然后加入缓冲液 ($30 \mu\text{mol/L}$) 常规处理 24 h,每孔加入 $200 \mu\text{L}$ DCFH-DA 探针溶液,于培养箱中避光孵育 1 h (37°C),荧光显微镜下观察染色情况,Image J 软件统计荧光强度。

2.9 Western blotting 检测 Nrf2、HO-1 和 p-PERK 蛋白表达

取对数生长期的 CNE1 细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中进行培养,待细胞贴壁后,按“2.2”项下方法处理,收集细胞,加入 RIPA 裂解液提取蛋白, 100°C 加热 10 min 使蛋白变性。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,于 5% 脱脂牛奶中 4°C 封闭 2 h,分别加入 Nrf2、HO-1、p-PERK 和 β -actin 抗体 ($1:1000$ 、 $1:1000$ 、 $1:1000$ 、 $1:4000$), 4°C 孵育过夜,洗涤 3 次加入二抗 ($1:1000$),室温孵育 2 h,于曝光仪中滴加 ECL 显色液显影,Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 免疫荧光检测 p-PERK 和 Nrf2 表达

取对数生长期的 CNE1 细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于提前包被好的含细胞爬片的 24 孔板中,按“2.2”项下方法处理,弃去培养基,无菌 PBS 漂洗

后使用 4% 多聚甲醛固定,加入通透液和 BSA 进行封闭,之后加入一抗孵育过夜 ($1:100$),洗涤后滴加荧光二抗避光孵育 2 h,洗涤后滴加 DAPI 复染核,洗涤后滴加抗荧光猝灭剂封片,荧光显微镜下观察并拍照,用 Image J 软件统计荧光强度。

2.11 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件进行数据的分析和处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析配合 Tukey 检验对多组间的数据进行比较。

3 结果

3.1 山豆根提取物抑制 CNE1 细胞生长

采用不同质量浓度的山豆根提取物处理 NP69 和 CNE1 细胞 12、24、48 h,如表 1 所示,与对照组比较,山豆根提取物显著降低 CNE1 细胞存活率 ($P < 0.05$ 、 0.01),呈剂量和时间相关性。山豆根提取物对 NP69 细胞存活率无明显影响。

3.2 山豆根提取物使 CNE1 细胞阻滞于 G_2/M 期

通过流式细胞术观察山豆根提取物对 CNE1 细胞周期的影响,如表 2 所示,与对照组比较,山豆根提取物中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01);山豆根提取物各剂量组 S 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), G_2/M 期细胞比例显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 Fer-1 缓解山豆根提取物诱导 CNE1 细胞死亡

采用不同的抑制剂来探究山豆根提取物诱导 CNE1 细胞死亡的方式,如表 3 所示,与山豆根提

表 1 山豆根提取物对 NP69 和 CNE1 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on viability of CNE1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NP69 细胞存活率/%			CNE1 细胞存活率/%		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
对照	—	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
山豆根提取物	100	99.05 $\pm$ 0.83	98.11 $\pm$ 1.02	97.91 $\pm$ 0.75	94.01 $\pm$ 1.04	85.84 $\pm$ 0.92*	80.29 $\pm$ 1.26**
	200	97.59 $\pm$ 1.25	96.30 $\pm$ 1.38	94.07 $\pm$ 1.68	86.28 $\pm$ 1.77*	76.63 $\pm$ 1.29**	64.10 $\pm$ 1.41**
	400	95.63 $\pm$ 1.49	94.69 $\pm$ 1.54	91.83 $\pm$ 1.92	68.44 $\pm$ 1.35**	52.07 $\pm$ 1.94**	33.72 $\pm$ 0.83**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 2 山豆根提取物对 CNE1 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on cell cycle of CNE1 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	G_0/G_1 期细胞/%	S 期细胞/%	G_2/M 期细胞/%
对照	—	52.49 $\pm$ 1.54	27.86 $\pm$ 1.38	19.52 $\pm$ 1.73
山豆根提取物	100	50.71 $\pm$ 1.69	24.03 $\pm$ 1.12*	25.12 $\pm$ 1.86*
	200	47.38 $\pm$ 1.25*	18.51 $\pm$ 1.04**	34.37 $\pm$ 2.43**
	400	39.26 $\pm$ 1.17**	8.13 $\pm$ 0.59**	52.78 $\pm$ 2.61**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

表 3 不同抑制剂对山豆根提取物处理 CNE1 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on viability of CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	细胞存活率/%
对照	—	100.00 ± 2.17
山豆根提取物	400 mg·L ⁻¹	50.76 ± 1.85**
山豆根提取物 + Z-VAD-FMK	400 mg·L ⁻¹ + 20 μmol·L ⁻¹	54.32 ± 2.29
山豆根提取物 + Necrostatin-1	400 mg·L ⁻¹ + 50 μmol·L ⁻¹	49.61 ± 1.73
山豆根提取物 + 3-MA	400 mg·L ⁻¹ + 2 mmol·L ⁻¹	46.49 ± 2.02
山豆根提取物 + Fer-1	400 mg·L ⁻¹ + 10 μmol·L ⁻¹	74.97 ± 2.46##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与山豆根提取物组比较: ## $P < 0.01$, 表 4、5 同

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract group, same as Table 4, 5

取物组比较, 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK、自噬抑制剂 3-MA 以及坏死抑制剂 Necrostatin-1 并不能缓解山豆根提取物引起的细胞存活率的降低, 而铁死亡抑制剂 Fer-1 能显著减弱山豆根提取物引起的 CNE1 细胞死亡 ($P < 0.01$)。表明铁死亡参与了山豆根提取物诱导的 CNE1 细胞死亡。

3.4 Fer-1 减弱山豆根提取物诱导的 CNE1 细胞 Fe²⁺水平升高

铁死亡依赖于细胞中的 Fe²⁺水平。如表 4 所示, 与对照组比较, 山豆根提取物组细胞中 Fe²⁺水平明显升高 ($P < 0.01$); 与山豆根提取物组比较, 给予 Fer-1 后细胞中 Fe²⁺水平显著降低 ($P < 0.01$)。

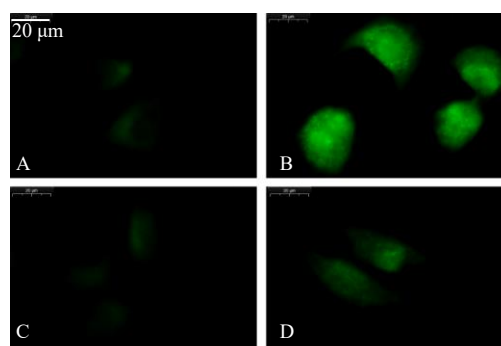
3.5 NAC 改善山豆根提取物对 CNE1 细胞 ROS、脂质过氧化和 GSH 水平的影响

ROS 和脂质过氧化水平升高也是铁死亡的重要特征。如图 1 和表 5 所示, 与对照组比较, 山豆根提取物组细胞中 ROS 的荧光强度明显增强 ($P < 0.01$), 脂质过氧化水平升高 ($P < 0.01$), GSH 水平降低 ($P < 0.01$); 给予抗氧化剂 NAC 后, 显著抑制

表 4 Fer-1 对山豆根提取物处理的 CNE1 细胞中 Fe²⁺水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of Fer-1 on iron content in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract-treated CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	Fe ²⁺ /(μg·mL ⁻¹)
对照	—	44.69 ± 3.37
山豆根提取物	400 mg·L ⁻¹	136.02 ± 10.15**
Fer-1	10 μmol·L ⁻¹	42.88 ± 2.90
山豆根提取物 + Fer-1	400 mg·L ⁻¹ + 10 μmol·L ⁻¹	60.34 ± 4.46##



A-对照组 B-山豆根提取物组 C-NAC 组 D-NAC+山豆根提取物组

A-blank group B-*Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract group C-NAC group D-NAC + *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract group

图 1 NAC 抑制山豆根提取物诱导的 CNE1 细胞 ROS 水平升高

Fig. 1 NAC inhibits elevation of ROS level in CNE1 cells induced by *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract

山豆根提取物引起的 ROS 和脂质过氧化水平升高 ($P < 0.01$), 显著上调 GSH 水平 ($P < 0.01$)。表明山豆根提取物能够诱导 CNE1 细胞发生脂质过氧化损伤。

3.6 山豆根提取物抑制 CNE1 细胞中 SLC7A11 和 GPX4 铁死亡相关蛋白的表达

SLC7A11 和 GPX4 是铁死亡的标志蛋白。如图 2 和表 6 所示, 与对照组比较, 山豆根提取物各剂量组细胞中 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平均明

表 5 NAC 对山豆根提取物处理的 CNE1 细胞中 ROS、脂质过氧化和 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 5 Effect of NAC on levels of ROS, lipid peroxidation and GSH in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract-treated CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量	ROS 荧光强度/%	脂质过氧化/%	GSH/%
对照	—	1.00 ± 0.09	100.00 ± 3.04	100.00 ± 2.59
山豆根提取物	400 mg·L ⁻¹	3.17 ± 0.31**	330.52 ± 16.44**	48.41 ± 2.08**
NAC	1 mmol·L ⁻¹	1.04 ± 0.08	99.82 ± 4.13	103.60 ± 3.34
NAC+山豆根提取物	1 mmol·L ⁻¹ + 400 mg·L ⁻¹	1.69 ± 0.17##	150.73 ± 7.35##	84.16 ± 3.12##

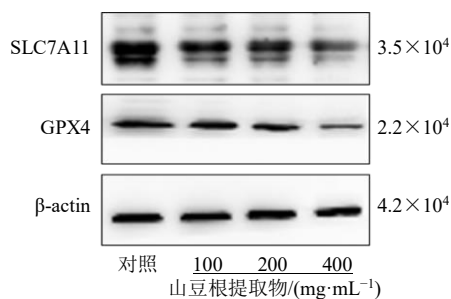


图 2 山豆根提取物对 CNE1 细胞 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on SLC7A11 and GPX4 protein expressions in CNE1 cells

表 6 山豆根提取物对 CNE1 细胞中 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 6 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on SLC7A11 and GPX4 protein expressions in CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	SLC7A11/β-actin	GPX4/β-actin
对照	—	1.61 ± 0.10	1.44 ± 0.09
山豆根提取物	100	1.38 ± 0.08*	1.20 ± 0.07*
	200	0.87 ± 0.07**	0.82 ± 0.05**
	400	0.35 ± 0.03**	0.19 ± 0.02**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。

3.7 山豆根提取物激活 CNE1 细胞中 Nrf2/HO-1 信号通路

采用 Nrf2 siRNA 研究山豆根提取物对 CNE1 细胞 Nrf2/HO-1 信号通路的影响, 结果如图 3 和表 7 所示, 与 NC siRNA 组比较, Nrf2 siRNA 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 山豆根提取物+NC siRNA 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与山豆根提取物+NC siRNA 组比较, 山豆根提取物+Nrf2 siRNA 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 表明山豆根提取物激活了细胞中 Nrf2/HO-1 信号。

表 8 Nrf2 siRNA 对山豆根提取物处理的 CNE-1 细胞 Fe²⁺、脂质过氧化和 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 8 Effect of Nrf2 siRNA on Fe²⁺, lipid peroxidation and GSH levels in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract-treated CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	Fe ²⁺ /(μg·mL ⁻¹)	脂质过氧化/%	GSH/%
NC siRNA	—	42.86 ± 2.44	100.00 ± 4.15	100.00 ± 2.96
Nrf2 siRNA	—	44.19 ± 3.37	107.84 ± 8.05	96.72 ± 2.53
山豆根提取物+NC siRNA	400	140.52 ± 9.63**	352.16 ± 17.39**	43.54 ± 2.07**
山豆根提取物+Nrf2 siRNA	400	71.43 ± 4.21###	215.57 ± 11.22###	66.68 ± 3.29###

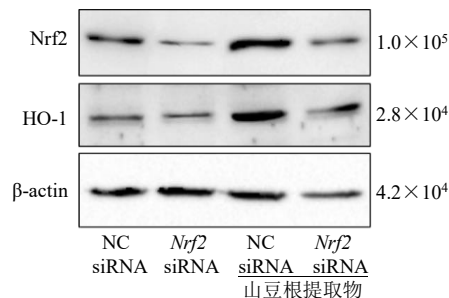


图 3 山豆根提取物对 CNE1 细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on Nrf2 and HO-1 protein expressions in CNE1 cells

表 7 山豆根提取物对 CNE1 细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 7 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on Nrf2 and HO-1 protein expressions in CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin
NC siRNA	—	0.72 ± 0.05	0.45 ± 0.03
Nrf2 siRNA	—	0.15 ± 0.02**	0.39 ± 0.03**
山豆根提取物+NC siRNA	400	1.69 ± 0.07**	1.57 ± 0.05**
山豆根提取物+Nrf2 siRNA	400	0.41 ± 0.03###	0.68 ± 0.04###

与 NC siRNA 组比较: ** $P < 0.01$; 与山豆根提取物+NC siRNA 组比较: ### $P < 0.01$, 表 8 同

** $P < 0.01$ vs NC siRNA group; ### $P < 0.01$ vs *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract + NC siRNA group, same as fig. 8

3.8 Nrf2 siRNA 缓解山豆根提取物对 CNE-1 细胞 Fe²⁺、脂质过氧化和 GSH 水平的影响

进一步探究 Nrf2 在山豆根提取物致 CNE1 细胞铁死亡中的作用, 如表 8 所示, 与山豆根提取物+NC siRNA 组比较, 山豆根提取物+Nrf2 siRNA 组细胞中 Fe²⁺和脂质过氧化水平显著降低 ($P < 0.01$), GSH 水平明显升高 ($P < 0.01$), 表明 Nrf2 信号的活化参与了山豆根提取物诱导的 CNE-1 细胞铁死亡。

3.9 山豆根提取物激活 CNE1 细胞中 PERK 信号通路

如图 4、5 和表 9 所示, 随着山豆根提取物处理时间的延长, CNE1 细胞中 p-PERK 荧光强度以及蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.01$), 表明山豆根提取物激活 CNE1 细胞中的 PERK 信号通路。

3.10 抑制 PERK 减弱了山豆根提取物诱导的 Nrf2 信号通路活化

采用 PERK 抑制剂 GSK2606414 研究 PERK 信号在山豆根提取物诱导 Nrf2 信号活化中的作用, 结

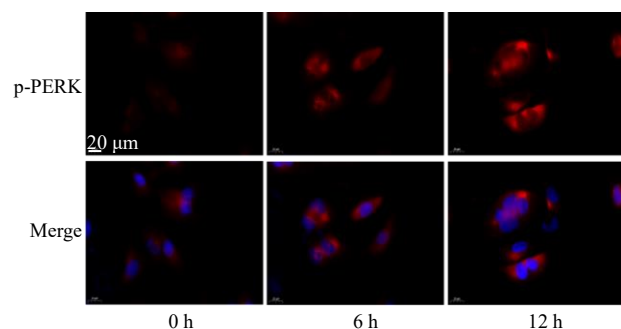


图 4 免疫荧光检测山豆根提取物对 CNE1 细胞 p-PERK 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on p-PERK protein expression in CNE1 cells detected by immunofluorescence

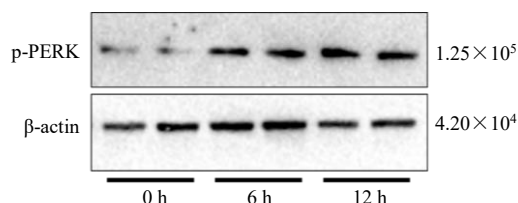


图 5 Western blotting 检测山豆根提取物对 CNE1 细胞 p-PERK 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on p-PERK protein expression in CNE1 cells detected by Western blotting

表 9 山豆根提取物对 CNE1 细胞 p-PERK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 9 Effect of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract on p-PERK protein expression in CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	p-PERK 荧光强度/%	p-PERK/β-actin
0 h	1.00 ± 0.11	0.15 ± 0.02
6 h	2.37 ± 0.24**	0.75 ± 0.05**
12 h	3.12 ± 0.28**	1.13 ± 0.08**

与 0 h 组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs 0 h group

果如图 6 和表 10 所示, 山豆根提取物处理后细胞核中 Nrf2 的荧光强度明显升高 ($P<0.01$); 与山豆根提取物组比较, GSK2606414+山豆根提取物组细胞核中 Nrf2 的荧光强度明显降低 ($P<0.01$)。

如表 11 所示, 与对照组比较, 山豆根提取物组细胞中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.01$); 与山豆根提取物组比较, GSK2606414+

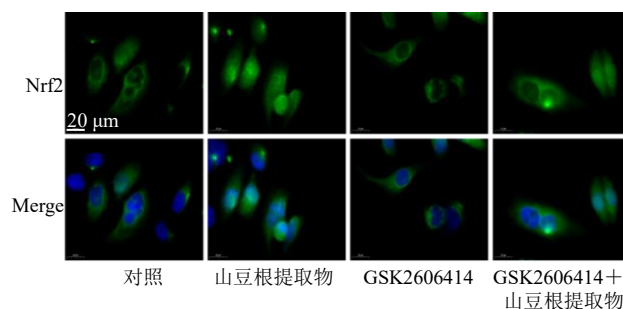


图 6 GSK2606414 对山豆根提取物处理的 CNE1 细胞核中 Nrf2 表达的影响

Fig. 6 Effect of GSK2606414 on nuclear Nrf2 expression in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract-treated CNE1 cells

表 10 GSK2606414 对山豆根提取物处理的 CNE1 细胞核中 Nrf2 荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 10 Effect of GSK2606414 on nuclear Nrf2 fluorescence intensity in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract-treated CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量	细胞核 Nrf2 荧光强度/%
对照	—	1.00 ± 0.14
山豆根提取物	400 mg·L ⁻¹	3.43 ± 0.31**
GSK2606414	1 μmol·L ⁻¹	0.94 ± 0.12
GSK2606414 + 山豆根提取物	1 μmol·L ⁻¹ + 400 mg·L ⁻¹	1.69 ± 0.19 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与山豆根提取物组比较: ^{##} $P<0.01$,

表 11 同

** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract group, same as table 11

表 11 GSK2606414 对山豆根提取物处理的 CNE1 细胞中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 11 Effect of GSK2606414 on Nrf2 and HO-1 mRNA expressions in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* extract-treated CNE1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	mRNA 相对表达量	
		Nrf2	HO-1
对照	—	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08
山豆根提取物	400 mg·L ⁻¹	3.26 ± 0.24**	3.77 ± 0.19**
GSK2606414	1 μmol·L ⁻¹	0.98 ± 0.06	1.04 ± 0.08
GSK2606414 + 山豆根提取物	1 μmol·L ⁻¹ + 400 mg·L ⁻¹	1.73 ± 0.13 ^{##}	1.90 ± 0.14 ^{##}

山豆根提取物组细胞中 *Nrf2* 和 *HO-1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明 PERK 活化参与了山豆根提取物诱导的 Nrf2/HO-1 信号激活。

4 讨论

鼻咽癌在祖国医学中属“失荣”“鼻疽”“控脑砂”等, 病因病机多为机体本身正气不足, 肺气及肺阴虚损, 易外感毒邪, 蕴火熏灼, 肝胆湿热同时凝结, 使热毒痰瘀聚集而发病。天然植物提取物已被视为抗肿瘤药物的重要来源, 其总体毒性和不良反应与化学合成药物相比明显降低^[13]。国医大师李济仁临床使用山豆根、射干、茜草、鱼脑石等药物治疗鼻咽癌效果显著, 对热毒痰浊之邪所致鼻咽癌患者尤佳^[14]; 戴安伟教授临床辨证组方使用山豆根、石上草、炒薏苡仁、夏枯草、苍耳草等配伍补益脾肾之品治疗鼻咽癌, 疗效显著^[15]。山豆根能够抑制人食道癌 Eca-109 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞、人非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖^[9,16-18]。本研究结果进一步发现, 山豆根提取物能够有效抑制鼻咽癌 CNE1 细胞的增殖。

铁死亡是一种主要由细胞内铁积累和脂质过氧化引起的细胞死亡形式。过量的铁通过 Fenton 反应产生 ROS, 导致铁死亡。此外, 脂质过氧化和 GSH 的耗竭在铁死亡的发生过程中也起着关键作用^[19-20]。网络药理学研究发现, 槲皮素在山豆根化合物靶点中位居首位^[21], 铁结合能力强, 广泛存在于线粒体, 能够直接或通过降低 PERK 介导的内质网应激对脂代谢紊乱和线粒体氧化损伤产生改善作用, 还可对铁死亡诱导剂所产生的肿瘤细胞铁死亡发挥保护作用, 参与肿瘤细胞的启动、促进和发展等全阶段^[22-23]。本研究结果表明, 给予山豆根提取物后, CNE1 细胞中的 ROS、脂质过氧化和 Fe^{2+} 含量上调, GSH 水平降低。抗氧化剂 NAC 或者铁死亡抑制剂 Fer-1 明显抑制了山豆根提取物引起的 CNE1 细胞死亡。这些发现证实了铁死亡与山豆根提取物诱导的细胞死亡有关。

HO-1 是一种内质网锚定酶, 能够把亚铁血红素代谢为具有促氧化活性的 Fe^{2+} 、一氧化碳和抗氧化的胆绿素。HO-1 作为 Nrf2 的下游靶基因, 在多种氧化应激条件下能够对细胞起到保护作用。然而, 越来越多的研究表明, Nrf2 的高表达也是引起铁死亡的一个重要因素。桦木科植物提取物通过触发 Nrf2 的过表达来诱导人结肠癌细胞的铁死亡。在纤维肉瘤 HT-1080 细胞中, Nrf2 可加速铁死亡诱导剂

引起的细胞铁死亡。阿霉素诱导的心肌细胞铁死亡也是由 Nrf2 介导的 HO-1 上调所引起的^[24]。以上结果表明, Nrf2/HO-1 可通过调控细胞内铁含量来诱导铁死亡。本研究中山豆根提取物可上调 Nrf2 和 HO-1 表达, 进一步采用 Nrf2 siRNA 发现, 抑制 Nrf2 不仅减弱了 HO-1 表达水平的升高, 同时也减弱了山豆根提取物引起的 Fe^{2+} 积累。这些结果表明, Nrf2/HO-1 信号通路的活化在山豆根提取物引起的铁死亡中发挥重要作用。

ROS 的产生与内质网应激有关, 内质网是调节蛋白质合成、折叠、分泌或翻译后修饰的专门细胞器。作为对微环境刺激的反应, 内质网中的蛋白质错误折叠并积累, 这一过程被称为内质网应激。为了应对内质网应激, 肿瘤细胞通过启动包括 PERK 通路在内的未折叠蛋白反应。PERK 激活后能够促进 Nrf2 从 Nrf2/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 复合物上的解离, 随后 Nrf2 进入到细胞核中促进下游基因的表达。研究表明, PERK 的活化与癌症的发生有关^[25], 并且在铁死亡中发挥重要作用^[26]。本研究结果发现, 山豆根提取物激活了 CNE1 细胞中的 PERK 信号, PERK 抑制剂的使用减弱了山豆根提取物引起的细胞死亡和 Nrf2/HO-1 信号通路的活化。山豆根提取物对肿瘤细胞的抑制作用与其诱导 p53 的过表达有关, p53 表达水平的升高也会引起肿瘤细胞的铁死亡和细胞周期的阻滞, p53 在山豆根提取物引起的 CNE1 细胞铁死亡以及细胞周期阻滞中的作用需要进一步的研究。

本研究发现, 山豆根提取物诱导的 CNE1 细胞铁死亡与其诱导 ROS 过量生成和激活 PERK/Nrf2 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wei K R, Zheng R S, Zhang S W, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma incidence and mortality in China, 2013 [J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 90.
- [2] Young Y H. Irradiated ears in nasopharyngeal carcinoma survivors: A review [J]. *Laryngoscope*, 2019, 129(3): 637-642.
- [3] 余卓锦, 周世卿, 杨朝杰, 等. 李云英中医药分阶段协同放化疗治疗鼻咽癌经验 [J]. *四川中医*, 2021, 39(7): 1-4.
- [4] 邱宝珊. 中医药治疗 24 例晚期鼻咽癌的疗效观察 [J]. *新中医*, 1994, 26(9): 10-12.

- [5] 柳吉玲, 劳国平, 王杰. 中医药治疗鼻咽癌放疗后不良反应临床研究 [J]. 中医药临床杂志, 2018, 30(1): 124-126.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 28.
- [7] 周思雨, 陈金鹏, 刘志东, 等. 山豆根的化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1510-1521.
- [8] Chui C H, Lau F Y, Tang J C O, *et al.* Activities of fresh juice of *Scutellaria barbata* and warmed water extract of *Radix Sophorae Tonkinensis* on anti-proliferation and apoptosis of human cancer cell lines [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(2): 337-341.
- [9] 张奇峰. 山豆根提取物体外抗肿瘤实验研究 [J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(9): 1269-1271.
- [10] 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.
- [11] Wei R R, Zhao Y Q, Wang J, *et al.* Tagitinin C induces ferroptosis through PERK-Nrf2-HO-1 signaling pathway in colorectal cancer cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(11): 2703-2717.
- [12] 傅月朦, 余登香, 王淑娜, 等. 山豆根黄酮类成分药理作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6234-6244.
- [13] 张建斌, 陈晨, 陶泽璋. 植物提取物抗肿瘤研究进展 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(8): 579-584.
- [14] 卢祥之. 国医大师李济仁经验良方赏析 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 159-163.
- [15] 黄辰羊, 戴安伟. 戴安伟教授运用中药治疗鼻咽癌放疗反应经验 [J]. 四川中医, 2014, 32(5): 9-11.
- [16] 李宜鲜, 魏华琳. 山豆根乙醇提取物对 Lewis 肺癌小鼠的抗肿瘤作用 [J]. 陕西中医药大学学报, 2021, 44(3): 86-91.
- [17] Jeong G S, Li B, Lee D S, *et al.* Lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens* protect mouse hippocampal cells against glutamate-induced neurotoxicity via the induction of heme oxygenase-1 [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(10): 1964-1967.
- [18] Ko W G, Kang T H, Kim N Y, *et al.* Lavandulylflavonoids: A new class of *in vitro* apoptogenic agents from *Sophora flavescens* [J]. *Toxicol Vitro*, 2000, 14(5): 429-433.
- [19] 唐玥萌, 孙军, 袁萍. 癌症中与脂质过氧化相关的铁死亡抑制机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, doi: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2022.10.1352.
- [20] 杨凤娟, 谭宁, 张天禹, 等. 谷胱甘肽在肿瘤细胞发生铁死亡过程中的作用研究 [J]. 世界华人消化杂志, 2021, 29(15): 901-907.
- [21] 汪艳平, 韦正, 蒋利荣, 等. 基于网络药理学的山豆根抗癌机制研究 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(17): 165-169.
- [22] Nisha V M, Anusree S S, Priyanka A, *et al.* Apigenin and quercetin ameliorate mitochondrial alterations by tunicamycin-induced ER stress in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174(4): 1365-1375.
- [23] Li X C, Zeng J Y, Liu Y P, *et al.* Inhibitory effect and mechanism of action of quercetin and quercetin Diels-Alder anti-dimer on erastin-induced ferroptosis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(3): 205.
- [24] Wang Y L, Yan S, Liu X M, *et al.* PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(10): 1982-1995.
- [25] 欧阳仲瑞, 柴双, 赵海杞, 等. 内质网应激 PERK 通路在肿瘤中的研究进展 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2018, 32(1): 38-41.
- [26] Lee Y S, Lee D H, Choudry H A, *et al.* Ferroptosis-induced endoplasmic reticulum stress: Cross-talk between ferroptosis and apoptosis [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(7): 1073-1076.

[责任编辑 李亚楠]