

基于非靶代谢组学研究薏苡仁脂亚微乳诱导胰腺癌细胞铁死亡的分子机制

薛 帅^{1,2,5}, 沈玲霜^{1,2#}, 陈俊艳^{1,2}, 陈凯迪^{1,2}, 陈 容^{1,2}, 戚雨薇^{1,2}, 王杭婕^{1,2}, 汪 红^{1,2}, 李 玮³, 程桂林³, 穆朝峰^{1,2}, 熊 阳^{1,2}, 谷满仓^{1,2,3,4*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053
2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310053
3. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江 杭州 310053
4. 浙江中医药大学松阳研究院, 浙江 丽水 323400
5. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310006

摘要: **目的** 阐明薏苡仁脂亚微乳 (*Coicis Semen* lipid submicron emulsion, CSE) 调控代谢重编程诱导胰腺癌细胞铁死亡的作用机制。**方法** 构建高脂饮食原位胰腺癌荷瘤小鼠模型, 探讨 CSE 抗肿瘤作用; 利用 UPLC-MS/MS 技术检测胰腺肿瘤细胞内小分子代谢物和相关差异代谢途径; 采用试剂盒检测 CSE 对脂肪细胞与胰腺癌细胞共培养模型中胰腺癌细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、脂质蓄积、过氧化水平、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA)、亚铁离子、线粒体形态、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的影响; 免疫组化染色、组织染色检测胰腺肿瘤组织内 GPX4 和溶质载体家族 7 成员 11 (recombinant solute carrier family 7, SLC7A11) 的表达、脂质蓄积及脂质过氧化水平。**结果** CSE 能够显著抑制胰腺肿瘤的生长 ($P < 0.001$); 影响胰腺癌细胞内谷胱甘肽代谢和甘油磷脂代谢通路 ($P < 0.01$); 增加脂肪细胞与胰腺癌细胞共培养模型中胰腺癌细胞内脂质积累、ROS 和 FFA 水平、脂质过氧化和亚铁离子含量 ($P < 0.05$), 降低 GSH、GPX4 水平和 MMP ($P < 0.05$)。铁死亡抑制剂 (ferrostatin-1, Fer-1) 与 CSE 联用能逆转 CSE 介导的胰腺癌细胞铁死亡 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** CSE 可通过诱导细胞 GSH 耗竭和过氧化脂质蓄积, 破坏细胞内氧化还原平衡, 诱导铁死亡从而抑制胰腺癌细胞生长。

关键词: 薏苡仁脂亚微乳; 胰腺癌; 代谢组学; 氧化还原失衡; 铁死亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)21-7313-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.012

Molecular mechanism of ferroptosis induced by *Coicis Semen* lipid submicron emulsion in pancreatic cancer cells based on non-target metabolomics

XUE Shuai^{1,2,5}, SHEN Lingshuang^{1,2}, CHEN Junyan^{1,2}, CHEN Kaidi^{1,2,3}, CHEN Rong^{1,2,3}, QI Yuwei^{1,2}, WANG Hangjie^{1,2}, WANG Hong^{1,2}, Li Wei³, CHENG Guilin³, MU Chaofeng^{1,2}, XIONG Yang^{1,2}, GU Mancang^{1,2,3,4}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
3. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China
4. Songyang Research Institute of Zhejiang Chinese Medical University, Lishui 323400, China
5. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

Abstract: Objective To elucidate the role of Yiyiren (*Coicis Semen*) lipid submicron emulsion (CSE) in regulating metabolic reprogramming to induce ferroptosis in pancreatic cancer cells. **Methods** To investigate the anti-tumor effect of CSE by constructing a high-fat diet in situ pancreatic cancer-bearing mouse model; UPLC-MS/MS technology was used to detect small molecule metabolites

收稿日期: 2024-05-11

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目 (LZ23H290001); 国家自然科学基金项目 (82474338, 82274364, 82174095); 浙江中医药大学重点科研项目 (2023JKZDZC07)

作者简介: 薛 帅, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药靶向递药系统的体内外评价。E-mail: xs10131023@163.com

#共同第一作者: 沈玲霜, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药靶向递药系统的体内外评价。E-mail: shenlingshuang@zcmu.edu.cn

*通信作者: 谷满仓, 教授, 研究方向为中药靶向递药系统构建及体内外评价。E-mail: gmancang@zcmu.edu.cn

and related differential metabolic pathways in pancreatic tumor cells. The kit was used to detect the effects of CSE on glutathione (GSH), glutathione peroxidase 4 (GPX4), lipid accumulation, peroxidation level, reactive oxygen species (ROS), free fatty acid (FFA), ferrous ion, mitochondrial morphology and mitochondrial membrane potential (MMP) in pancreatic cancer cells in the co-culture model of adipocytes and pancreatic cancer. The expression of GPX4 and recombinant solute carrier family 7 (SLC7A11), lipid accumulation and lipid peroxidation in pancreatic tumor tissues were detected by immunohistochemical staining and tissue staining.

Results CSE significantly inhibited the growth of pancreatic tumors ($P < 0.001$). CSE significantly affected glutathione metabolism and glycerophospholipid metabolism pathways in pancreatic cancer cells ($P < 0.01$). CSE treatment significantly increased lipid accumulation, ROS, FFA, lipid peroxidation and ferrous ion content in pancreatic cancer cells in the co-culture model of adipocytes and pancreatic cancer cells ($P < 0.05$). At the same time, the levels of GSH, GPX4 and MMP were significantly decreased ($P < 0.05$). Ferrostatin-1 (Fer-1) combined with CSE could reverse CSE-mediated ferroptosis in pancreatic cancer cells ($P < 0.05, 0.01$).

Conclusion CSE can inhibit the growth of pancreatic cancer cells by inducing GSH depletion and lipid peroxide accumulation, destroying intracellular redox balance and inducing ferroptosis.

Key words: *Coicis Semen* lipid submicron emulsion; pancreatic cancer; metabolomics; imbalance of oxidation-antioxidation; ferroptosis

胰腺癌是一种恶性程度极高的肿瘤，其 5 年生存率仅为 10%，主要原因在于 80% 的患者表现为不可切除或存在转移性疾病。虽然手术切除是胰腺导管腺癌的唯一治愈方法，但其适用范围有限，仅有不到 20% 的患者被认为适合进行手术治疗^[1]。由于缺乏有效的分子靶向药物和治疗靶点，传统的化疗成为主要的治疗手段。因此，迫切需要探索新的药物治疗策略和方法。

近年来，靶向肿瘤细胞脆弱的代谢平衡被视为一种有效的抗癌策略^[2]。代谢变化在癌症的发生和发展中起着至关重要的作用，癌细胞的新陈代谢被重新编程以支持其快速扩散。据临床前癌症模型和临床试验的结果显示，在胰腺癌的进展中，脂质代谢的作用尤为突出^[3]。为维持细胞增殖，癌细胞必须不断产生 DNA、蛋白质和脂质等维持生长必需的代谢物^[4]。研究发现，饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸可促进胰腺癌细胞的生长，多不饱和脂肪酸的积累有利于脂质过氧化物的氧化，从而促进癌细胞发生铁死亡。铁死亡是一种新发现的铁依赖调节性细胞死亡，主要由脂质过氧化物在细胞膜上的毒性积累引起^[5]。谷胱甘肽（glutathione, GSH）依赖的谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4, GPX4）被发现可以通过将脂质氢过氧化物转化为无毒的脂质醇来防止铁死亡^[6]。因此，通过调控脂质代谢，改变氧化还原平衡以诱导胰腺癌细胞铁死亡被认为是一种极具潜力的治疗策略。

薏苡仁脂亚微乳（*Coicis Semen* lipid submicron emulsion, CSE）作为一种来源于薏苡仁的静脉脂肪乳，被广泛应用于胰腺癌的治疗。薏苡仁的主要生物活性成分是脂肪酸，具有显著的抗肿瘤活性。薏苡仁油中不饱和脂肪酸占总甘油三酯脂肪酸的 84% 以上，

其中主要为油酸（31.42%）和亚油酸（47.38%）^[7]。多不饱和脂肪酸可诱导胰腺癌细胞膜发生过氧化反应，导致铁死亡^[8]。研究发现，薏苡仁油通过调节线粒体功能损伤诱导胰腺癌细胞凋亡^[9]。因此，本研究推测 CSE 可能通过调节脂质代谢、破坏细胞内氧化还原平衡诱导胰腺癌细胞铁死亡。

本研究基于高脂饮食原位移植胰腺肿瘤小鼠模型，通过 ip 给予小鼠 CSE 监测肿瘤生长情况，分析各组小鼠内源性小分子代谢物的变化；建立小鼠 MC3T3-L1 前脂肪细胞与 Pan02 胰腺癌细胞共培养体系，探究 CSE 对胰腺癌细胞氧化还原水平的影响；利用铁死亡抑制剂和肿瘤组织染色考察 CSE 对胰腺癌细胞铁死亡的影响，为 CSE 临床治疗胰腺癌提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

C57BL/6J 雄性小鼠，3~6 周龄，体质量（ 19 ± 2 ）g，购自上海 BK 公司，实验动物许可证号 20210614-06，合格证号 IACUC-20210614-06。动物饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心，室温（ 20 ± 1 ）℃、湿度 45%~50% 的环境中，饲养期间动物自由进食饮水。本研究动物实验经浙江中医药大学动物实验伦理委员会批准，所有动物实验遵循浙江中医药大学动物研究中心的有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则。

1.2 仪器

小动物活体成像仪器（美国 Xenogen 公司）；AXIO SCOPE.A1 型蔡司正置显微镜（日本 Zeiss 公司）；TI-s 型倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司）；数字病理切片（荧光）扫描分析仪（日本 OLYMPUS 公司）；LSM880 型激光共聚焦显微镜（德国 Zeiss

公司); 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); 台式高速冷冻离心机 (德国 Effendorf 公司); QE 高分辨质谱仪 (赛默飞世尔科技公司); ACQUITY UPLC I-Class plus 高效液相色谱仪 (美国沃特世公司)。

1.3 细胞

小鼠胰腺癌 Pan02 细胞和 MC3T3-L1 前脂肪细胞购自宁波明州生物科技有限公司。

1.4 CSE

CSE 由浙江康莱特药业有限公司提供 (批号 2202271-2), 制备所得制剂中薏苡仁油质量分数为 10%, pH 值为 5.0~7.0, 2 μm 以下的颗粒不少于 95%, 炽灼残渣不超过 0.1%, 无 5 μm 以上颗粒。以甘油三油酸酯 ($\text{C}_{57}\text{H}_{104}\text{O}_6$) 计, 每克 CSE 含注射用薏苡仁油不少于 12.0 mg, 十六烷酸、十八烷酸、十八烯酸和十八二烯酸占总峰面积比分别为 11%~15%、1%~3%、43%~51% 和 36%~42%^[10]。

1.5 药品与试剂

萤火虫荧光素酶慢病毒 (批号 356768) 购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; 游离脂肪酸试剂盒 (批号 S0215)、GSH 检测试剂盒 (批号 S0052)、GPX4 试剂盒 (批号 S0058)、线粒体膜电位探针试剂盒 (批号 C2006)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 探针试剂盒 (批号 S0033S)、DAPI 染色液 (批号 061819191045) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; Phen Green SK 探针 (批号 P14313)、DMEM 培养基 (批号 11995065) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 小鼠骨髓间充质干细胞成脂分化试剂盒 (批号 RAXMX-9003) 购自河南赛业生物技术有限公司; 抗溶质载体家族 7 成员 11 (recombinant solute carrier family 7, SLC7A11, 批号 HA600098)、GPX4 (批号 ET1706-45) 抗体购自杭州华安生物科技有限公司; 甲酸、甲醇、乙腈 (色谱级, 批号 45985) 均购自德国默克有限公司; 4% 多聚甲醛 (批号 R20493) 购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

C57BL/6J 雄性小鼠适应性喂养 7 d, 喂养高脂饲料 12 周, 以小鼠的体质量、总血脂、总胆固醇和低密度脂蛋白水平均显著高于常规饲料喂养小鼠 ($P<0.05$) 作为评估标准, 成功构建了高脂饮食诱导肥胖小鼠模型。将对数生长期 Pan02 细胞以 2×10^7 个/mL 的密度与无血清培养基按 1:1 混合制备细胞悬液, 取 100 μL 细胞悬液注射到高脂饮食

诱导肥胖小鼠皮下, 15 d 后待移植瘤长至 1 cm^3 , 采用二氧化碳处死小鼠, 取生长良好的肿瘤组织, 并剪成约 1 mm^3 瘤块。ip 舒泰 (10 $\mu\text{L/g}$) 麻醉高脂饮食诱导肥胖小鼠, 定位小鼠胰腺部位, 在胰腺尾部植入上述瘤块, 缝合腹部, 即为原位移植瘤小鼠模型。本实验造模成功率为 70%, 将造模成功小鼠随机分为对照组和 CSE 组 (2.5 g/kg)。CSE 组 ip 0.8 mL CSE, 对照组 ip 等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 21 d。最后纳入统计小鼠 12 只, 每组 6 只。末次给药后采用二氧化碳处死小鼠, 取肿瘤组织用于后续研究。

2.2 生物发光成像检测

原位移植瘤小鼠 ip 100 μL 含 100 mg/kg D-荧光素钾的饱和溶液, 10 min 后, 使用异氟烷气体对小鼠进行麻醉, 并将其置于 IVIS 系统中进行活体成像。曝光时间设置为自动曝光。每只小鼠的生物发光 (bioluminescence, BLI) 信号在每个发光区域和曝光时间取平均值, 绘制 BLIrel 发光曲线。

2.3 代谢组学分析的样品制备

称取药物处理组和对照组胰腺肿瘤组织样品 30 mg 于 1.5 mL EP 管中, 加入内标。于 -20°C 预冷 2 min, 在研磨仪上研磨 2 min。冰水浴中超声 10 min 后, 于 -20°C 静置 30 min。将混合物 4°C 、13 000 r/min 离心 10 min。取上清液 300 μL , 注入 LC-MS 进样小瓶, 挥干溶液后, 用 300 μL 甲醇-水 (1:4) 涡旋 30 s, 超声 3 min 复溶, 离心后收集上清液。另取每个样品 2 μL 合并, 制备质控样品。

2.4 代谢组学数据分析

将所得数据矩阵导入 R studio 中进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 观察分析过程的整体分布和稳定性。火山图和热图用于评估 CSE 和对照组之间差异代谢物分布, 差异代谢物筛选标准为 $P<0.05$ 、倍性变化 (fold change, FC) = 1.5。通过 MetaboAnalyst 5.0 分析网站 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。

2.5 细胞培养

Pan02 细胞和 MC3T3-L1 细胞培养于含 100 IU/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中, 于 37°C 、饱和湿度 90%、5% CO_2 培养箱中培养。

2.6 脂肪细胞与胰腺癌细胞共培养模型

将 MC3T3-L1 细胞按 1×10^5 个/mL 接种于

Transwell 板。根据相关文献配制成脂诱导液^[1], 加入成脂诱导液 A 诱导 2 d 后, 再加入成脂诱导液 B 诱导 1 d, 交替诱导 3~4 次, 直至观察到脂滴出现, 表明成熟脂肪细胞诱导成功。同时, 取对数生长期的胰腺癌 Pan02 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于 Transwell 板下室, 培养 48 h, 构建脂肪细胞与肿瘤细胞共培养模型。

2.7 胰腺癌细胞内 ROS、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 含量测定

将共培养细胞分为对照组和 CSE 低、高剂量 (50、75 mg/mL) 组, 给药 48 h 后用含 $10 \mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的培养基代替含药培养基, 使用多功能酶标仪检测细胞内 ROS 水平。按照试剂盒说明书, 在共培养体系下室中的脂肪细胞和肿瘤细胞上清液中依次加入双蒸水、显色剂 I 和显色剂 II, 将混合物在 37°C 下孵育 5 min, 使用多功能酶标仪在 546 nm 处测量溶液的吸光度 (A) 值。

2.8 胰腺癌细胞线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 及线粒体形态检测

弃去细胞培养基, 用预冷 PBS 轻轻冲洗细胞, 加入 1 mL 细胞培养基和 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀后, 37°C 孵育 30 min, 使用多功能酶标仪测量细胞内荧光强度。分组同“2.7”项, 药物处理共培养下室 Pan02 细胞 48 h, 收集细胞, 获得厚度 70 nm 截面, 并利用 Surface View 模块参考文献方法生成表面结构及 3D 结构图^[12]。

2.9 胰腺癌细胞内 GSH、GPX4 水平测定

细胞分组同“2.7”项, 给药 48 h 后, 用 Triton X-100 细胞裂解液裂解细胞, 离心取上清液。将 $100 \mu\text{L}$ DTNB 溶液与等量上清液混合孵育 35 min, 根据不同浓度标准品测得的不同 A 值绘制标准曲线。在 412 nm 处检测各组共培养模型 Pan02 细胞的 A 值, 根据对照标准曲线计算 Pan02 细胞中 GSH 水平; 在 340 nm 处检测各组共培养模型 Pan02 细胞的 A 值, 根据对照标准曲线计算 Pan02 细胞中 GPX4 水平。

2.10 亚铁离子含量检测

将共培养细胞分为对照组、铁死亡抑制剂组 (200 nmol/L)、CSE (75 mg/mL) 组和铁死亡抑制剂 (200 nmol/L) + CSE (75 mg/mL) 组, 给药 48 h 后, 使用 Phen Green SK 荧光指示剂评估共培养模型中 Pan02 细胞的荧光。Phen Green SK 的荧光可以被铁离子和还原性二价亚铁离子猝灭。采用激光共聚焦观察胰腺癌细胞内绿色荧光金属指示剂分析亚铁离子含量。

2.11 脂质蓄积及过氧化水平检测

细胞分组同“2.10”项, 给药处理 48 h 后, 取出孔板, 用多聚甲醛固定细胞, 加入 $500 \mu\text{L}$ 配制好的油红 O 染色工作液, 静置 30 min, 弃去, PBS 洗涤 2~3 次, 将 24 孔板中爬片取出, 倒扣至载玻片上, 在显微镜下观察并拍照。给药结束后, 使用 C11-BODIPY 染料进行脂质过氧化染色, 并用激光共聚焦显微镜进行拍摄和半定量分析。

2.12 免疫组化检测分析

取小鼠肿瘤组织进行脱水、固定、包埋、切片脱蜡、组织修复 10 min、抗原修复后放在 H_2O_2 中 4 min、切片加入 10% BSA 封闭液 37°C 孵育 40 min, 滴加一抗 GPX4 (1:400) 和 SLC7A11 (1:400) 4°C 孵育过夜, PBS 洗涤后, 二抗 37°C 孵育 40 min, 滴加适量 DAB 显色剂, 进行苏木素染色、封片, 于显微镜下观察并拍照, 采用 Image-J 软件进行半定量分析。

2.13 统计学分析

组间比较采用 Student's t -test 或 One-way ANOVA, 并在 GraphPad Prism 8 使用 Tukey's post-hoc 检验校正多重比较, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺肿瘤生长的影响

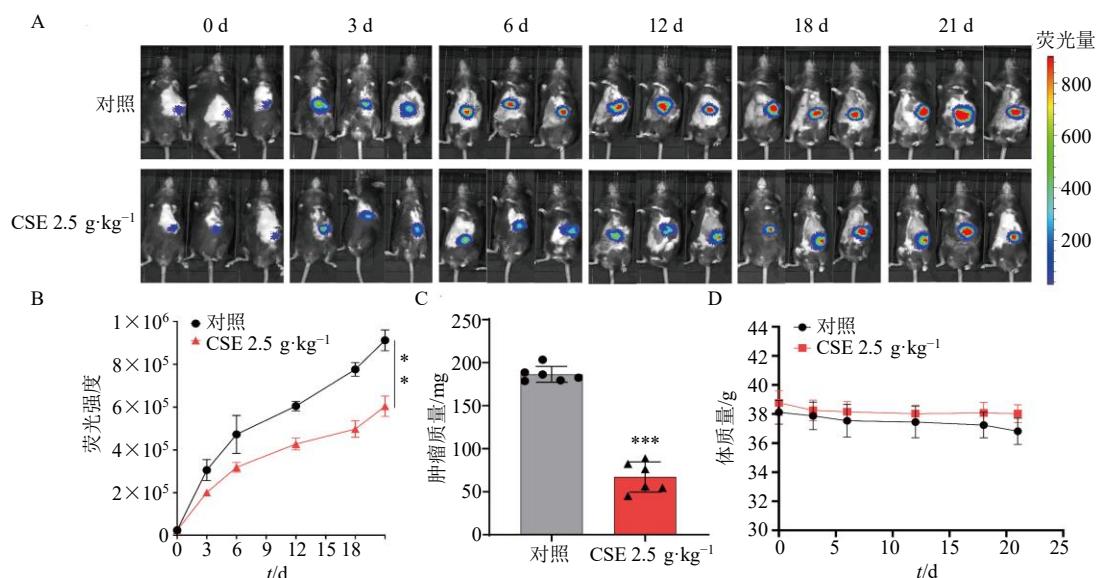
如图 1-A、B 所示, 与对照组比较, 高脂饮食原位移植瘤小鼠肿瘤随着 CSE 给药后荧光信号强度显著减弱 ($P < 0.01$)。如图 1-C 所示, CSE 能够显著抑制高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺癌肿瘤生长 ($P < 0.001$)。如图 1-D 所示, CSE 对高脂饮食原位移植瘤小鼠体重没有显著影响。

3.2 对高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺癌细胞代谢的影响

如图 2-A、B 所示, 对照组和 CSE 组的胰腺癌细胞内差异代谢物能较好的分离。如图 2-C 所示, 差异代谢物主要分布在脂质及类脂分子 (35.92%)、有机酸及其衍生物 (33.01%) 两大类。如图 2-D 显示, CSE 显著影响胰腺肿瘤细胞内甘油磷脂代谢 ($P < 0.05$) 和 GSH 代谢 ($P < 0.01$) 途径。结果表明, CSE 能够使高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺癌细胞内氧化还原水平发生显著变化。

3.3 对胰腺癌细胞 GSH 耗竭和脂质过氧化的影响

如图 3-A、B 所示, 与对照组比较, CSE (50、75 mg/mL) 处理后 Pan02 细胞内 GSH 和 GPX4 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。如图 3-C~F 所示,

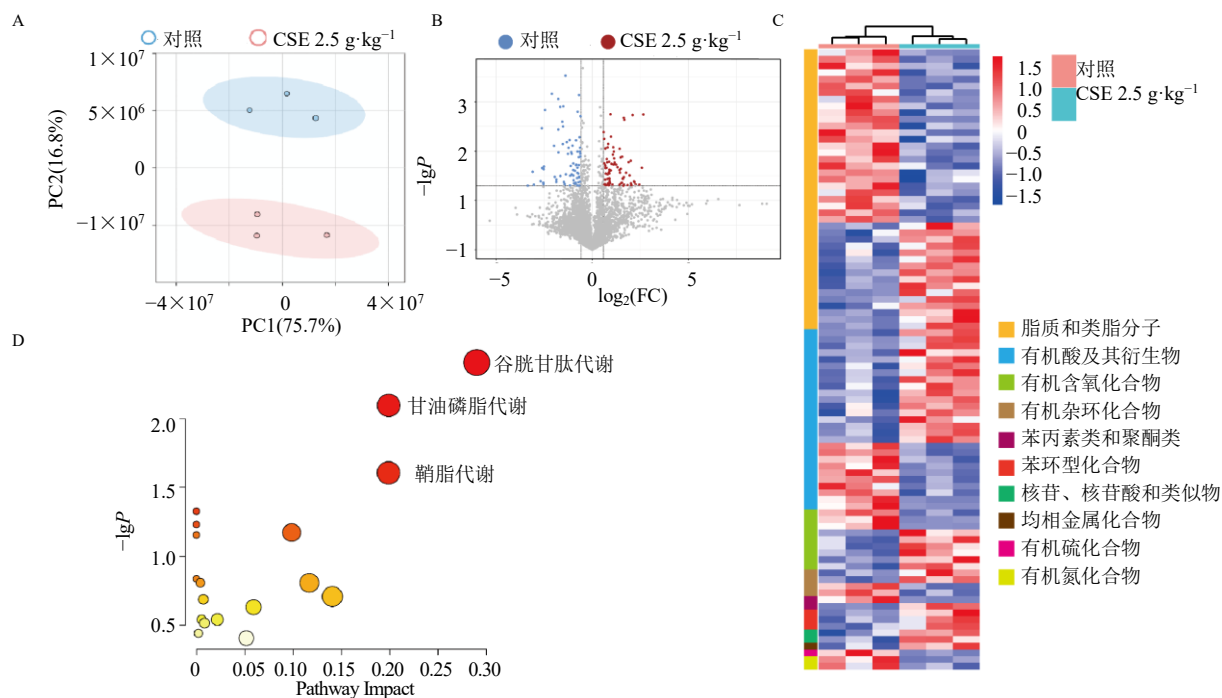


A、B-高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺肿瘤的代表性生物发光图像和生物发光强度分析折线图；C-肿瘤质量统计图；D-高脂饮食原位移植瘤小鼠体重折线图；与对照组比较：** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A, B-representative bioluminescence image and bioluminescence intensity curve of pancreatic tumor in orthotopic transplantation mice with high-fat diet; C-tumor resection weight statistics; D-body weight analysis of high-fat diet in orthotopic transplantation mice with high-fat diet; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 CSE 对高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of CSE on the growth of pancreatic tumor in high-fat diet in situ tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

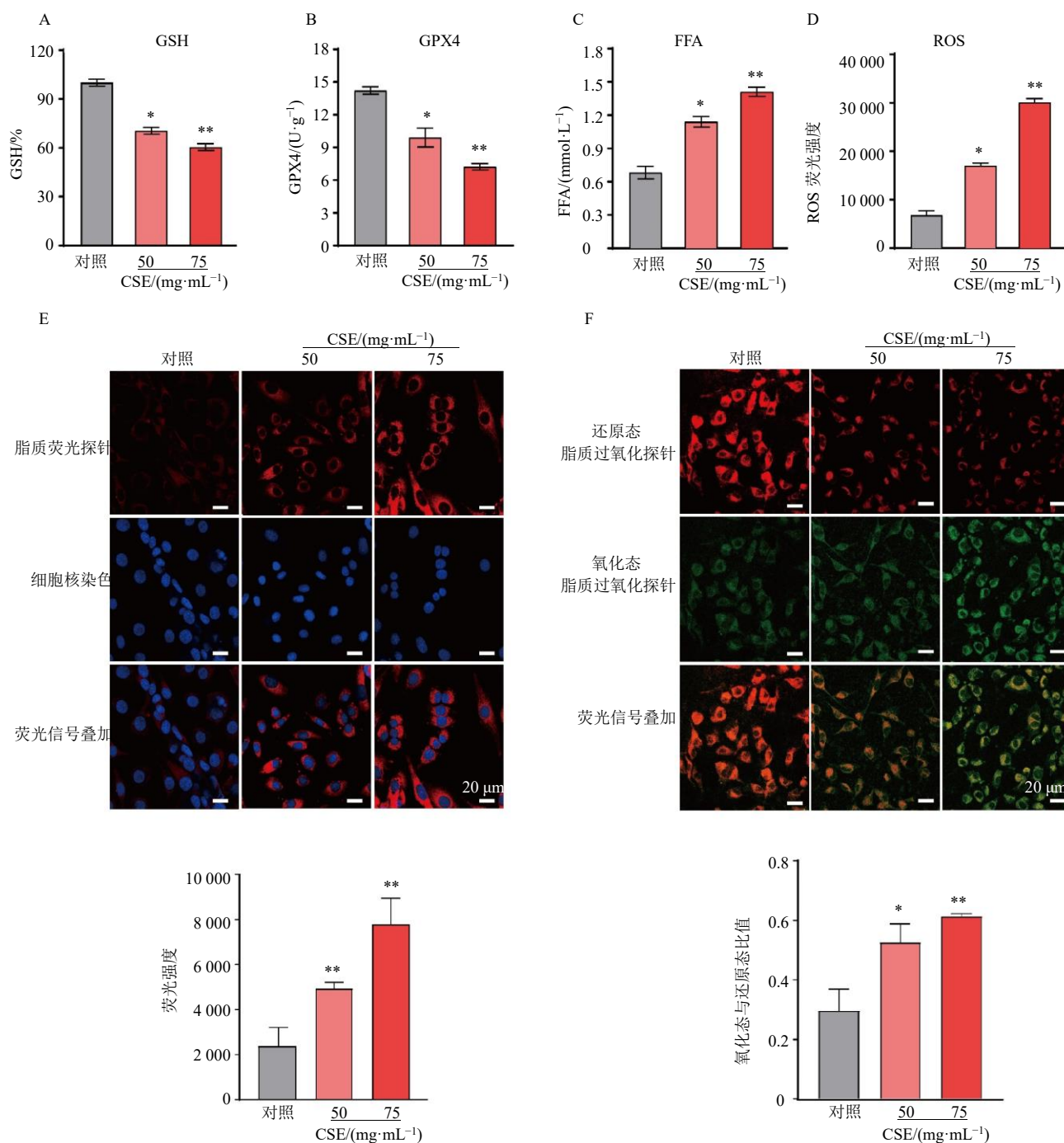


A-PCA 分析代谢物在肿瘤细胞中的分布；B-差异代谢物火山图；C-差异代谢物聚类热图；D-差异代谢通路气泡图。

A-PCA analysis of the metabolite distribution in tumor cells; B-differential metabolites volcano plot; C-cluster heat map of differential metabolites; D-differential metabolic pathway bubble chart.

图 2 CSE 给药对高脂饮食小鼠胰腺癌细胞代谢的影响

Fig.2 Effect of CSE administration on metabolism of pancreatic cancer cells in high-fat diet mice



A~D-共培养模型中 Pan02 细胞 GSH、GPX4、FFA、ROS 水平; E-脂质 C12-BODIPY 558/568 染色; F-C11-BODIPY (581/591) 染色; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

A—D-levels of GSH, GPX4, FFA and ROS in Pan02 cells treated; E-lipid C12-BODIPY 558/568 staining; F-C11-BODIPY (581/591) staining; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

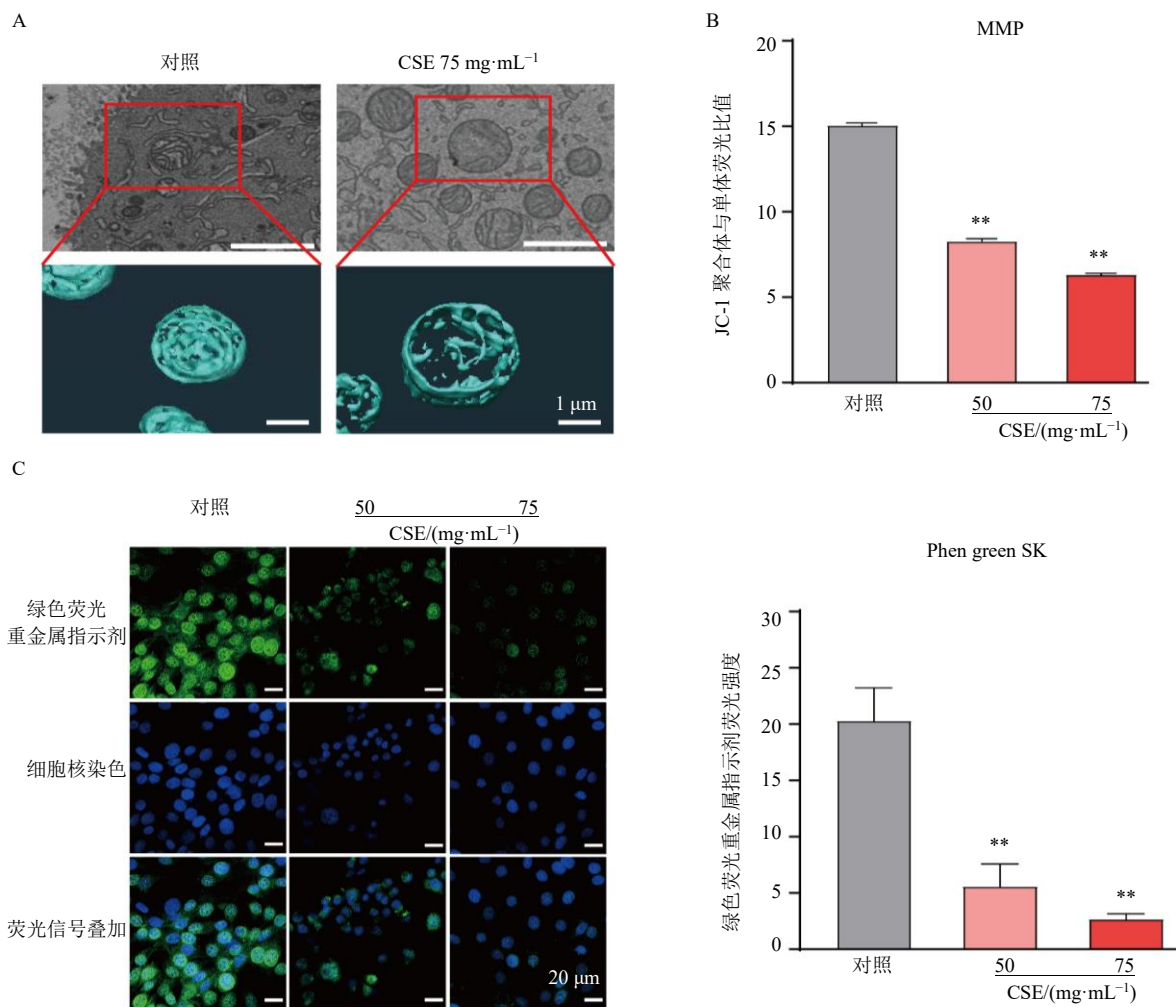
图 3 CSE 给药对胰腺癌细胞内氧化还原水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of CSE administration on redox level in pancreatic cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与对照组比较, CSE (50、75 mg/mL) 处理后均显著增加细胞内 FFA、ROS、脂质蓄积、脂质过氧化水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。表明 CSE 可使胰腺癌细胞还原水平降低、脂质氧化水平升高。

3.4 对胰腺癌细胞线粒体功能障碍及亚铁离子水平的影响

如图 4-A、B 所示, 与对照组比较, 高剂量 CSE 导致 Pan02 细胞线粒体嵴减少或消失, 且导致胰腺癌细胞



A、B-CSE 对共培养模型中 Pan02 细胞线粒体形态及膜电位的影响；C-CSE 对共培养模型中 Pan02 细胞内亚铁离子含量的影响。
A, B-effects of CSE on mitochondrial morphology and membrane potential of Pan02 cells in co-culture model; C-effect of CSE on ferrous ion content in Pan02 cells in co-culture model.

图 4 CSE 给药对胰腺癌细胞线粒体功能和亚铁离子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of CSE administration on mitochondrial function and ferrous ion levels in pancreatic cancer cells

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

内线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$), 而低剂量 CSE 对线粒体内脊形态无显著影响。如图 4-C 所示, CSE 处理的 Pan02 细胞 Phen Green SK 荧光减弱, 表明细胞内亚铁离子水平显著升高 ($P < 0.01$), 表明 CSE 可导致胰腺癌细胞线粒体功能障碍和亚铁离子蓄积, 诱导铁死亡。

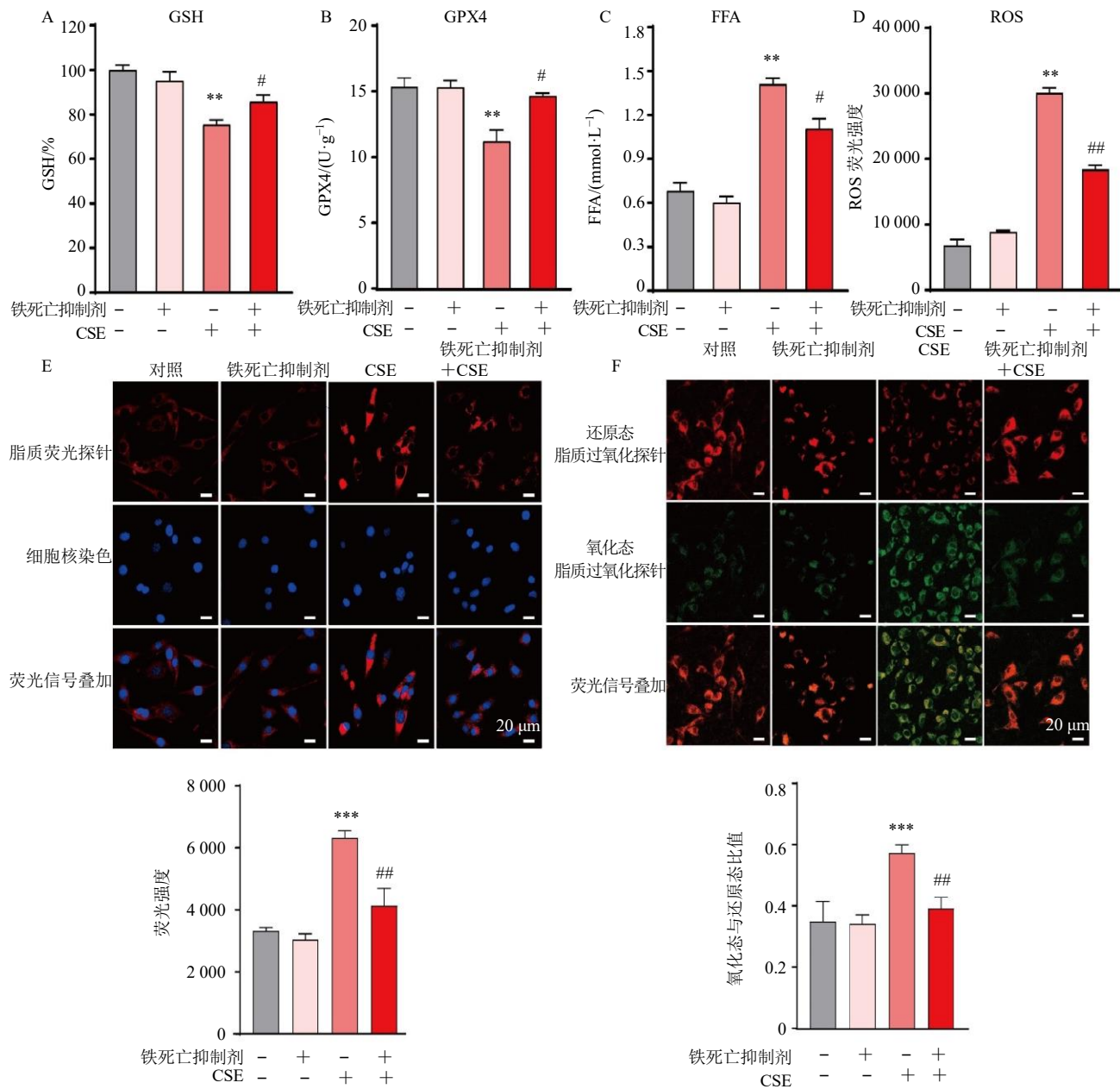
3.5 铁死亡抑制剂显著逆转 CSE 介导的 GSH 耗竭和脂质过氧化

如图 5-A~F 所示, 与对照组比较, CSE 处理后的胰腺癌细胞内 GSH、GPX4 水平显著降低, ROS、FFA、中性脂质、脂质过氧化水平显著增加 ($P < 0.01, 0.001$)。与 CSE 组比较, 铁死亡抑制剂与 CSE 联合使用可显著逆转上述指标 ($P < 0.05$ 、

0.01), 表明 CSE 可导致胰腺癌细胞 GSH 耗竭和脂质过氧化, 诱导胰腺癌细胞发生铁死亡。

3.6 铁死亡抑制剂显著逆转 CSE 导致的线粒体功能障碍和亚铁离子蓄积

如图 6-A~C 所示, 与对照组比较, CSE 处理后, 共培养模型 Pan02 细胞内线粒体嵴显著减少和膜电位显著降低, 同时胰腺癌细胞内亚铁离子水平显著增加 ($P < 0.01$)。与 CSE 组比较, 铁死亡抑制剂与 CSE 共同处理组的 Pan02 细胞线粒体形态恢复正常、MMP 显著升高、亚铁离子水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明, CSE 可通过影响胰腺癌细胞内线粒体功能及亚铁离子蓄积诱导其发生铁死亡。



A~D-铁死亡抑制剂联合 CSE 给药对共培养模型中 Pan02 细胞内 GSH、GPX4、FFA、ROS 水平的影响；E、F-铁死亡抑制剂联合 CSE 给药对共培养模型中 Pan02 细胞脂质蓄积及过氧化水平的影响；与对照组比较：** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ；与 CSE 组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ，图 6 同。

A—D-effects of ferroptosis inhibitor combined with CSE on GSH, GPX4, FFA and ROS in Pan02 cells in co-culture model; E, F-effect of ferroptosis inhibitor combined with CSE on lipid accumulation and peroxidation level of Pan02 cells in co-culture model; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs CSE group; same as figure 6.

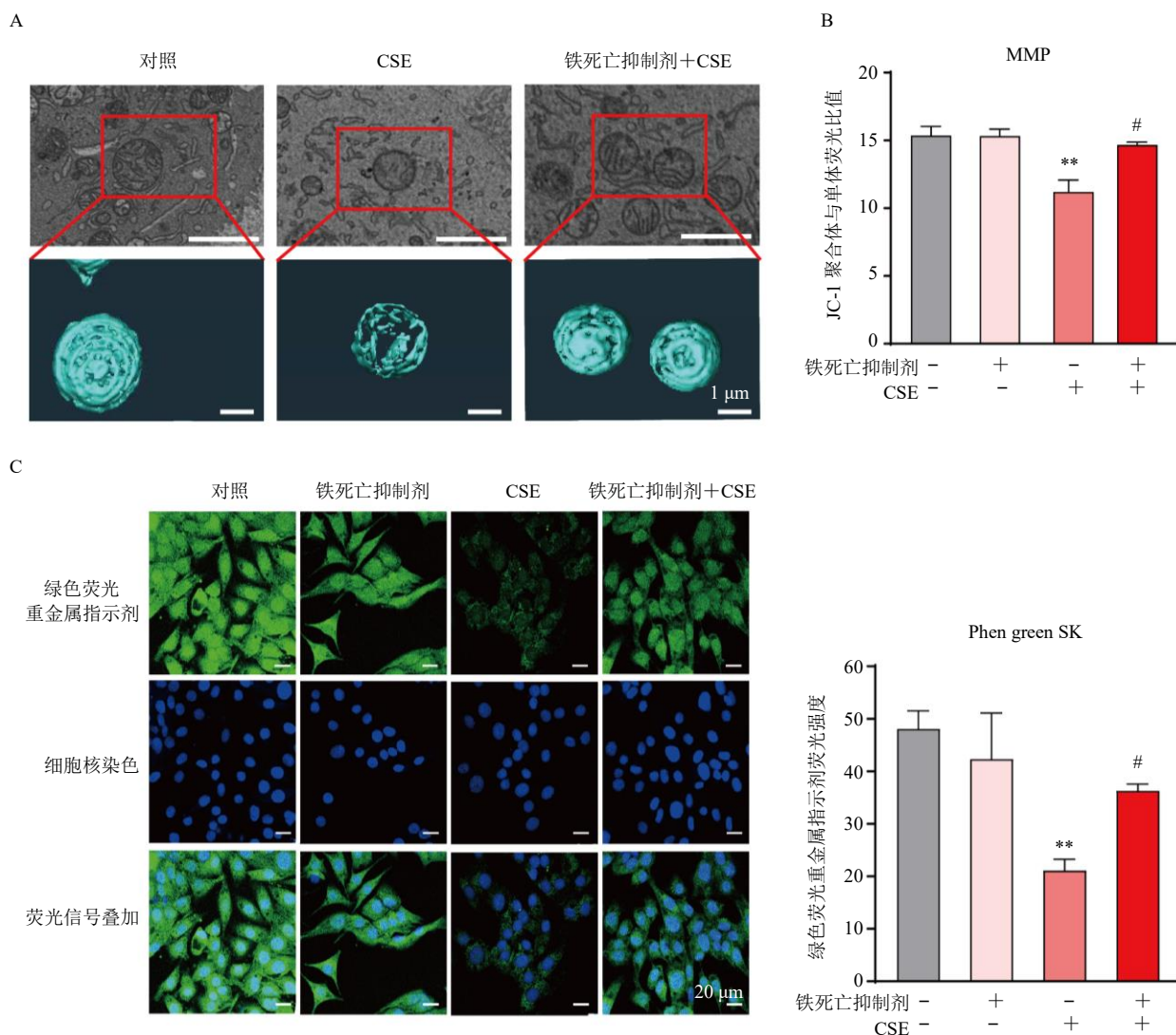
图 5 铁死亡抑制剂联合 CSE 给药对胰腺癌细胞谷胱甘肽和脂质过氧化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of ferroptosis inhibitor combined with CSE on glutathione and lipid peroxidation in pancreatic cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 对高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺肿瘤组织蛋白表达和脂质过氧化的影响

如图 7-A 所示，与对照组比较，CSE 处理显著降低高脂饮食原位移植瘤小鼠胰腺肿瘤组织中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达 ($P < 0.001$)。油红 O 染色及

脂质过氧化探针结果如图 7-B、C 所示，与对照组比较，CSE 处理后，胰腺癌细胞内脂质显著增加，脂质过氧化水平也显著增加 ($P < 0.001$)。结果表明，CSE 可通过削弱胰腺癌细胞抗氧化及增强脂质过氧化来诱导铁死亡。



A、B-铁死亡抑制剂联合 CSE 给药对共培养模型中 Pan02 细胞线粒体形态及膜电位的影响；C-铁死亡抑制剂联合 CSE 给药对共培养模型中 Pan02 细胞内亚铁离子含量的影响。

A, B-effects ferroptosis inhibitor combined with CSE on mitochondrial morphology and membrane potential of Pan02 cells in co-culture model; C-effect of ferroptosis inhibitor combined with CSE on the content of ferrous ion in Pan02 cells in co-culture model.

图 6 铁死亡抑制剂联合 CSE 给药对胰腺癌细胞线粒体功能及亚铁离子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

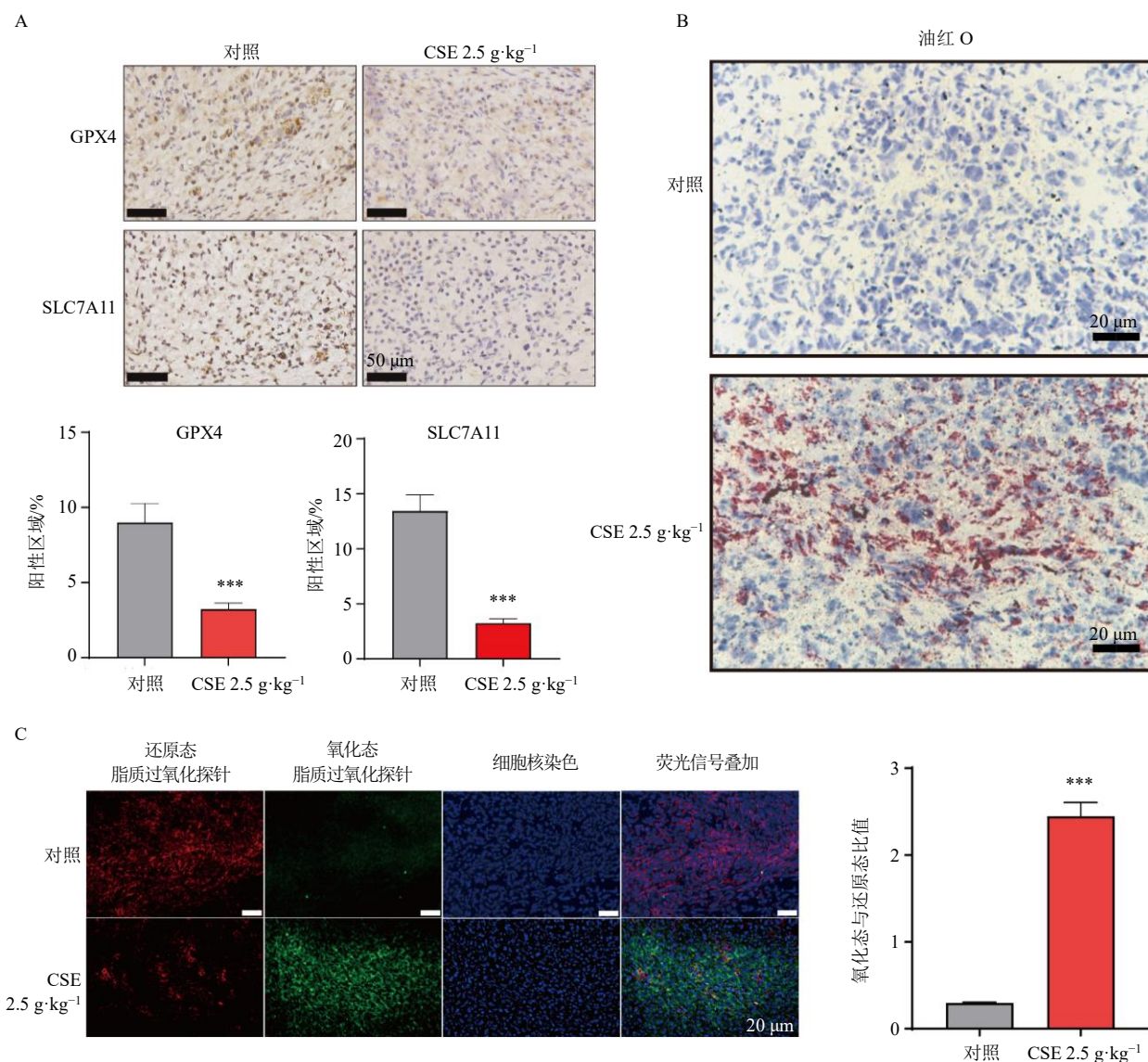
Fig. 6 Effects of ferroptosis inhibitor combined with CSE on mitochondrial function and ferrous ion level in pancreatic cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

胰腺癌在世界范围内的发病率和致死率呈现日益增长趋势。流行病学研究显示肥胖人群患胰腺癌概率比正常体重人群更高，且高脂饮食导致的肥胖与患者预后呈现负相关趋势，是胰腺癌患者复发与转移的高危因素^[13]。胰腺癌周围的脂肪细胞浸润与胰腺癌风险独立相关，是肿瘤进展的积极因素。肿瘤细胞与成熟脂肪细胞共培养导致代谢表型改变，为肿瘤细胞提供能量和营养底物，进一步促进胰腺癌细胞的恶性发展^[14]。目前，脂质代谢异常被确立

为恶性肿瘤的标志和肿瘤治疗的关键靶点。超重、2 型糖尿病和富含饱和脂肪酸的饮食都是公认的胰腺癌危险因素^[15]。本研究构建了高脂饮食诱导小鼠的原位移植瘤模型，并采用多种方法监测 CSE 给药对高脂饮食小鼠胰腺肿瘤生长的影响，结果表明 CSE 能够有效抑制高脂饮食小鼠胰腺肿瘤的生长。

CSE 主要成分为二亚油酸-甘油三油酸酯、亚油酸-甘油二油酸酯和甘油三油酸酯^[16]。本研究推测 CSE 可能通过调节脂质代谢重编程发挥抗肿瘤作用。为阐明 CSE 抑制胰腺癌细胞生长的确切机制，



A-CSE 对高脂饮食原位移植瘤小鼠肿瘤组织内 GPX4、SLC7A11 蛋白表达免疫组化分析；B-CSE 对高脂饮食原位移植瘤小鼠肿瘤组织脂质蓄积的油红 O 染色；C-CSE 对高脂饮食原位移植瘤小鼠肿瘤组织脂质过氧化水平影响。

A-immunohistochemical analysis of GPX4 and SLC7A11 protein expression in tumor tissues of high-fat diet in situ tumor-bearing mice by CSE; B-oil red O staining of lipid accumulation in tumor tissue of high-fat diet in situ tumor-bearing mice by CSE; C-effect of CSE on lipid peroxidation in tumor tissues of high-fat diet in situ tumor-bearing mice.

图 7 CSE 给药对高脂饮食小鼠胰腺癌肿瘤组织 GPX4、SLC7A11、脂质蓄积及过氧化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of CSE administration on GPX4, SLC7A11, lipid accumulation and peroxidation in pancreatic cancer tumor tissues of mice with high-fat diet ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

采用代谢组学技术分析 CSE 对胰腺癌细胞代谢的影响，实验结果表明，CSE 显著改变胰腺癌细胞内的甘油磷脂和有机酸等代谢物，同时发现差异代谢物主要富集在甘油磷脂代谢及谷胱甘肽代谢通路。多不饱和脂肪酸，特别是亚油酸、肾上腺素和硬脂酸，可抑制胰腺癌细胞的体外增殖^[17]。研究表明，癌细胞中的氧化磷脂酰乙醇胺是铁死亡的执行者。

GSH 在人体内作为抗氧化剂发挥着重要作用，通过与巯基和亲电自由基形成键合，有效降低细胞内脂质过氧化物浓度^[18]。

为进一步研究 CSE 对胰腺癌细胞氧化还原水平的影响，本研究建立脂肪细胞和胰腺癌细胞组共培养体系^[19]。结果表明，CSE 处理后，共培养模型中胰腺癌细胞内 GSH 和 GPX4 水平呈浓度相关性

降低。通过铁死亡抑制剂联合 CSE 给药,进一步证明 CSE 降低 GSH 和 GPX4 水平降低与诱导胰腺癌细胞铁死亡有关。

多不饱和脂肪酸作为脂质代谢的底物,有效地参与 ROS 并启动脂质过氧化,在脂质代谢中起着至关重要的作用^[20]。此外,多不饱和脂肪酸还具有抗炎和免疫调节作用,抑制胰腺癌的增殖^[21]。通过脂质吞噬作用释放脂肪酸可导致细胞内游离脂肪酸蓄积。ROS 在癌症中的双重作用取决于其在细胞内的浓度。ROS 与细胞膜上多不饱和脂肪酸相互作用时,可发生过氧化反应,破坏脂质双分子层,使细胞膜解体,促进细胞铁死亡。结果显示,CSE 处理显著改善了 Pan02 细胞中的脂质积累和脂质过氧化。并且增加了 ROS 和 FFA 水平。铁死亡抑制剂与 CSE 共同施用进一步验证了 CSE 导致的 Pan02 细胞脂质氧化水平升高与铁死亡之间的相关性。

铁死亡是一种不同于细胞凋亡的死亡形式,其特征是铁依赖性脂质过氧化物在致死水平上的积累^[22-23]。线粒体功能障碍是铁死亡的标志性特征^[24]。随后,在细胞膜上发生与多不饱和脂肪酸的级联过氧化反应,形成脂质过氧化物^[25]。这一过程破坏了细胞膜的结构完整性,导致细胞铁死亡^[26]。铁死亡常伴有线粒体功能障碍。结果表明,CSE 处理后,Pan02 细胞中线粒体嵴减少,膜电位降低。同时,观察到亚铁离子显著积累。加入铁死亡抑制剂进一步验证了 CSE 对胰腺癌细胞线粒体功能和亚铁离子水平的影响,强调其与铁死亡的关联。体内胰腺癌肿瘤组织染色数据显示,CSE 处理显著降低了 GPX4 和 SLC7A11 蛋白的表达,削弱胰腺癌细胞抗氧化能力。同时结果验证了 CSE 显著增加高脂饮食小鼠胰腺癌细胞内脂质积累和脂质过氧化水平,增加胰腺癌细胞内氧化水平。

本研究基于非靶代谢组学及体外实验发现 CSE 导致胰腺癌细胞 GSH 耗竭和过氧化脂质蓄积,破坏氧化还原平衡,诱导铁死亡。并在体内通过免疫组化及肿瘤组织染色验证 CSE 诱导胰腺癌细胞铁死亡的作用,为 CSE 治疗胰腺癌提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kolbeinsson H M, Chandana S, Wright G P, *et al.* Pancreatic cancer: A review of current treatment and novel therapies [J]. *J Invest Surg*, 2023, 36(1): 2129884.
[2] Li X L, Duan Z Y, Chen X T, *et al.* Impairing tumor

metabolic plasticity via a stable metal-phenolic-based polymeric nanomedicine to suppress colorectal cancer [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(23): e2300548.

[3] Qin C, Yang G, Yang J S, *et al.* Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better anticancer strategies [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 50.
[4] Momoh B J, Okere S O, Anyanwu G O. The anti-obesity effect of *Allium cepa* L. leaves on high fat diet induced obesity in male wistar rats [J]. *Clin Complementary Med Pharmacol*, 2022, 2(3): 100035.
[5] Lei G, Zhuang L, Gan B Y. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(7): 381-396.
[6] Zaloga G P. Narrative review of *n-3* polyunsaturated fatty acid supplementation upon immune functions, resolution molecules and lipid peroxidation [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 662.
[7] Yang J, Liu Y, Lu S N, *et al.* Coix seed oil regulates mitochondrial functional damage to induce apoptosis of human pancreatic cancer cells via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(7): 5897-5909.
[8] Woo J H, Li D, Wilsbach K, *et al.* Coix seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NFκB and protein kinase C signaling [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(12): 2005-2011.
[9] Chen X, Kang R, Kroemer G, *et al.* Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296.
[10] 国家新药转正标准 [S]. 2001: X30-93.
[11] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, *et al.* Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes [J]. *Anal Biochem*, 2012, 425(1): 88-90.
[12] Qi Y W, Liu Y H, Huang Y, *et al.* A three-dimensional technique for the visualization of mitochondrial ultrastructural changes in pancreatic cancer cells [J]. *J Vis Exp*, 2023(196): 65290.
[13] Sung H, Siegel R L, Torre L A, *et al.* Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(2): 88-112.
[14] Lyssiotis C A, Kimmelman A C. Metabolic interactions in the tumor microenvironment [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(11): 863-875.
[15] Eichmann F, Sellem L, Wittenbecher C, *et al.* Deep lipidomics in human plasma: Cardiometabolic disease risk and effect of dietary fat modulation [J]. *Circulation*, 2022, 146(1): 21-35.
[16] Yan B, Ai Y W, Sun Q, *et al.* Membrane damage during

- ferroptosis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1 [J]. *Mol Cell*, 2021, 81(2): 355-369.
- [17] Desideri E, Ciccarone F, Ciriolo M R. Targeting glutathione metabolism: Partner in crime in anticancer therapy [J]. *Nutrients*, 2019, 11(8): 1926.
- [18] Kershaw J C, Elzey B D, Guo X X, *et al.* Piceatannol, a dietary polyphenol, alleviates adipose tissue loss in pre-clinical model of cancer-associated *Cachexia* via lipolysis inhibition [J]. *Nutrients*, 2022, 14(11): 2306.
- [19] Das U N. Saturated fatty acids, MUFAs and PUFAs regulate ferroptosis [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(3): 309-311.
- [20] Cui W Q, Zhang J W, Wu D Q, *et al.* Ponocidin suppresses pancreatic cancer growth by inducing ferroptosis: Insight gained by mass spectrometry-based metabolomics [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98: 153943.
- [21] Zhao T T, Guo X J, Sun Y. Iron accumulation and lipid peroxidation in the aging retina: Implication of ferroptosis in age-related macular degeneration [J]. *Aging Dis*, 2021, 12(2): 529-551.
- [22] Takashi Y, Tomita K, Kuwahara Y, *et al.* Mitochondrial dysfunction promotes aquaporin expression that controls hydrogen peroxide permeability and ferroptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 161: 60-70.
- [23] 单娇娇, 赵杰, 刘珊, 等. 基于生物信息学的铁死亡机制相关胆管癌潜在治疗靶点和小分子药物筛选 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 1863-1871.
- [24] Gao M H, Yi J M, Zhu J J, *et al.* Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-363.
- [25] Lee J, Hyun D H. The interplay between intracellular iron homeostasis and neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(4): 918.
- [26] Du J, Wang T, Li Y, *et al.* DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131: 356-369.

[责任编辑 罗 曦]