

葫芦素 B 通过 ENPP2 影响铁死亡在结直肠癌耐药中的机制研究

王 凯, 高宗跃, 左振魁, 杨娅娟, 周琼阁

河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院) 肛肠科, 河南 郑州 450003

摘 要: **目的** 探讨葫芦素 B 通过影响铁死亡途径提高结直肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 的敏感性并研究其潜在机制。**方法** 构建结直肠癌耐药细胞株 HCT116/5-FU, 用低、高剂量 (5、15 $\mu\text{g/mL}$) 的葫芦素 B 分别处理 HCT116 和 HCT116/5-FU 细胞不同时间 (12、24、48、72 h), 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 实验检测细胞活力。利用生物信息学数据库探究外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 2 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2, ENPP2) 在结直肠癌中的表达情况及与预后的关系。免疫荧光检测葫芦素 B 对 HCT116/5-FU 细胞中 ENPP2 及铁死亡相关标志物 Fe^{2+} 含量、脂质过氧化水平等表达的影响。在 HCT116/5-FU 细胞中过表达 ENPP2, 检测细胞活力及铁死亡相关分子的表达。**结果** 成功构建了 HCT-116/5-FU 耐药细胞株, 并发现葫芦素 B 对该细胞株的生长具有较好的抑制作用, 表现出明显的时间-剂量相关性, 15 $\mu\text{g/mL}$ 葫芦素 B 作用 48 h 抑制率显著升高 ($P < 0.05$)。生物信息学分析显示, ENPP2 基因在结直肠癌组织中高表达, 且与患者预后不良密切相关。葫芦素 B 处理可升高 HCT-116/5-FU 细胞内的 Fe^{2+} 含量及脂质过氧化水平 ($P < 0.05$), 并影响铁死亡标志分子谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2) 的表达 ($P < 0.01$)。ENPP2 过表达可降低葫芦素 B 对 Fe^{2+} 含量、脂质过氧化和铁死亡的上调作用 ($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 葫芦素 B 通过抑制 ENPP2 的表达影响铁死亡提高结直肠癌细胞耐药的敏感性。

关键词: 结直肠癌; 葫芦素 B; 耐药; ENPP2; 铁死亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)06-2009-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.014

Study on mechanism of cucurbitacin B affecting ferroptosis via ENPP2 in colorectal cancer drug resistance

WANG Kai, GAO Zongyue, ZUO Zhenkui, YANG Yajuan, ZHOU Qiongge

Department of Anorectal, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine (The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine), Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To investigate whether cucurbitacin B (CuB) enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil (5-FU) by influencing the ferroptosis pathway and explore its potential mechanisms. **Methods** A colorectal cancer drug-resistant cell line HCT116/5-FU was established. HCT116 and HCT116/5-FU cells were treated with different concentrations of CuB (5, 15 $\mu\text{g/mL}$) for various durations (12, 24, 48, 72 h) and cell viability was assessed using the cell counting kit-8 (CCK-8) assay. Public bioinformatics databases were utilized to investigate the expression of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP2) in colorectal cancer and its correlation with prognosis. Immunofluorescence techniques were employed to detect the effects of CuB on the ENPP2 expression and ferroptosis-related markers Fe^{2+} concentration and lipid peroxidation levels in HCT116/5-FU cells. ENPP2 was overexpressed in HCT116/5-FU cells, and then cell viability and the expression of ferroptosis-related molecules were evaluated. **Results** The HCT116/5-FU drug-resistant cell line was successfully established, and CuB was found to significantly inhibit the growth of this cell line with a clear time-dose dependency ($P < 0.05$). Notably, the inhibition rate of CuB significantly increased at a concentration of 15 $\mu\text{g/mL}$ for 48h ($P < 0.05$). Bioinformatics analysis revealed that ENPP2 gene was highly expressed in colorectal cancer tissues and closely associated with poor patient prognosis. The Fe^{2+} concentration and lipid peroxidation levels in HCT116/5-FU cells were increased by CuB treatment ($P < 0.05$), with the expression of ferroptosis-related markers glutathione peroxidase 4

收稿日期: 2024-10-15

基金项目: 河南省科技攻关项目 (242102310142); 河南省中医药科学研究专项课题 (2023ZY2084); 河南省中医药拔尖人才培养项目 (2022ZYBJ11)

作者简介: 王 凯, 硕士研究生, 副主任医师, 从事中医药防治肛肠疾病的研究。E-mail: wk10236@163.com.

(GPX4) and cyclooxygenase 2 (COX2) was influenced ($P < 0.01$). Furthermore, overexpression of ENPP2 significantly reduced the up-regulation effects of CuB on intracellular Fe^{2+} concentration, lipid peroxidation levels and ferroptosis ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** CuB enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to drug resistance by influencing ferroptosis through the inhibition of ENPP2 expression.

Key words: colorectal cancer; cucurbitacin B; drug resistance; ENPP2; ferroptosis

结直肠癌是全球常见且致死率高的消化道恶性肿瘤，临床主要以氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康等单药或联合化疗方案进行治疗，但部分患者对化疗药物不敏感或逐步发展为化疗耐药，最终导致治疗失败^[1-2]。因此，深入探究结直肠癌的耐药机制并改善化疗耐药成为肿瘤治疗领域亟待解决的关键问题之一。

葫芦素 B 是从葫芦科植物中分离得到的天然产物，属于四环三萜类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性。葫芦素 B 能够有效抑制信号传导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的活化^[3-4]，而 STAT3 在多种肿瘤组织和细胞系中呈现持续活化状态，阻断 STAT3 信号传导可增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[5]。此外，STAT3 可调控外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 2 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2, ENPP2) 的表达^[6]，而 ENPP2 对肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移等行为具有重要影响，并能影响肿瘤对化疗药物的敏感性^[7]。铁死亡是化疗耐药的主要机制之一，其特征包括 Fe^{2+} 蓄积和脂质过氧化水平急剧上升^[8]，而与氧化应激和脂质过氧化密切相关的 ENPP2 也被证实可影响铁死亡^[9]。然而，葫芦素 B 通过 ENPP2 进而调控铁死亡以改善结直肠癌耐药的机制研究较少。因此，本研究以 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 建立的结直肠癌耐药细胞株 HCT116/5-FU 为研究对象，探究葫芦素 B 对结直肠癌耐药的影响及可能的机制，以期对结直肠癌的临床治疗提供实验思路新的作用靶点。

1 材料

1.1 细胞株

人结直肠癌细胞系 HCT116 (批号 CL-0096) 由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。

1.2 药品与试剂

葫芦素 B (批号 23114, 质量分数 99.9%)、5-FU (批号 252366) 均购自美国 MCE 公司；胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 2094466RP) 和

RPMI-1640 培养基 (批号 6123064) 均购自美国 Gibco 公司；质粒转染试剂 HP X-treme 购自 (批号 06366546001) 购于瑞士 Roche 公司；牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 批号 JS241520) 购自上海源叶生物科技有限公司； Fe^{2+} 检测探针 FerroOrange (批号 WM743) 购于日本同仁化学研究所；细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒 (批号 20231120) 购自北京 Solarbio 公司；脂质过氧化检测探针 C11-BODIPY 581/591 (批号 231013002) 购自武汉安捷凯生物医药公司；ENPP2 (批号 GR1000125-2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4, 批号 GR3369674-5)、环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2, 批号 GR222252)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 GR3386102-2) 一抗及偶联 Alexa Fluor 594 荧光染料的山羊抗兔二抗 (批号 GR3232361-3) 和偶联 FITC 荧光染料的山羊抗兔二抗 (批号 GR3237804-1) 购自英国 Abcam 公司；HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 33) 购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

2 方法

2.1 细胞培养及结直肠癌耐药细胞系 HCT116/5-FU 的构建

人结直肠癌 HCT116 细胞以 2×10^4 个/mL 密度接种于 RPMI-1640 培养基 (10%FBS, 1%双抗) 的 25 mL 培养瓶中，细胞于 5% CO_2 、37 °C 培养箱中培养，当细胞密度达到 80% 以上时即可进行传代培养，取对数生长期的细胞进行后续实验。采用逐步提高培养基中 5-FU 浓度的方法^[10]，间歇诱导肿瘤细胞耐药。预实验检测亲代细胞的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})，选择 5-FU 的初始浓度为 $0.5 \mu\text{mol/L}$ ^[11]，逐步增加 5-FU 浓度，筛选出对 5-FU 耐药的细胞继续培养，即为结直肠癌耐药细胞系 HCT116/5-FU。

2.2 HCT116/5-FU 细胞株耐药性检测

取对数生长期的 HCT116 细胞和耐药株

HCT116/5-FU 细胞, 分别制成 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 每孔加入 100 μ L, 分别采用含不同质量浓度 5-FU (1、2、4、8、16、32 mg/L) 的培养基^[12], 对照组为 RPMI-1640 培养基, 培养细胞 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 2 h, 多功能酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞耐药倍数, 耐药倍数 >3 则被认为耐药细胞构建成功^[13]。

耐药倍数 = HCT116/5-FU 细胞 IC_{50} /HCT116 细胞 IC_{50}

2.3 对 HCT116/5-FU 细胞生长抑制率的影响

将传代培养的 HCT116/5-FU 细胞分别消化、计数, 制成 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 每孔 100 μ L, 接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后, 将细胞分为 5-FU (12 mg/L) 组、5-FU (12 mg/L) + 葫芦素 B (5 μ g/mL) 组、5-FU (12 mg/L) + 葫芦素 B (15 μ g/mL) 组, 分别培养 12、24、48、72 h 后, 加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液孵育 2 h, 多功能酶标仪 450 nm 处读取 A 值, 计算逆转指数。

逆转指数 = 葫芦素 B 干预前 IC_{50} /葫芦素 B 干预后 IC_{50}

2.4 ENPP2 基因差异性表达及生存分析

利用 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<https://kmplot.com/analysis>) 计算总生存期 (overall survival, OS), 并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 分析 ENPP2 蛋白表达情况对结直肠癌患者生存率的影响。

2.5 免疫荧光检测相关分子的表达

取对数生长期的 HCT116/5-FU 细胞以 5×10^4 个/mL 密度接种于荧光培养皿, 将细胞分为对照组和葫芦素 B 低、高剂量 (5、15 μ g/mL) 组, 培养 48 h。去除培养基, PBS 缓冲液洗涤细胞, 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 加入 0.2% 的 Triton X-100, 室温孵育 10 min。用含 5% BSA 的封闭液室温孵育 30 min, 分别加入 ENPP2、GPX4、COX2 一抗 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。取出细胞复温 30 min, PBS 洗涤后加入 FITC 或 Alexa Fluor 594 标记的荧光二抗 (1:200), 室温避光孵育 1 h 后, 加入 DAPI 染料孵育 10 min。荧光显微镜观察并分析相关分子的表达变化。

2.6 Fe^{2+} 含量检测

采用 FerroOrange 试剂盒检测细胞中游离 Fe^{2+} 含量, 取对数生长期的 HCT116/5-FU 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于荧光培养皿, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育过夜。弃去上清液, 用 HBSS 缓冲液冲洗细胞 3 次, 葫芦素 B 低、高剂量 (5、15 μ g/mL) 继续培养 48 h, 加入 1 μ M/L 的 FerroOrange 工作液

孵育 30 min, 荧光显微镜观察拍照。

2.7 脂质过氧化检测

采用 C11 BODIPY 581/591 荧光探针检测细胞的脂质过氧化水平, 取对数生长期的 HCT116/5-FU 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板培养过夜, 葫芦素 B 低、高剂量 (5、15 μ g/mL) 继续培养 48 h 后, 加入 5 μ mol/L 的 C11 BODIPY 581/591 工作液, 孵育 30 min。弃去培养基, PBS 冲洗细胞 3 次, 在荧光显微镜下观察细胞脂质过氧化物水平的变化。

2.8 ENPP2 过表达的 HCT116/5-FU 细胞的建立及 Western blotting 检测 ENPP2 的表达

取对数生长期的 HCT116/5-FU 细胞, 消化后用含无血清培养液制成细胞悬液, 以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中培养过夜, 当细胞密度约达到 70%, 进行 ENPP2 过表达质粒转染。用 PBS 洗涤细胞后加入转染复合物混合液 0.5 mL, RPMI-1640 培养液 1.5 mL, 轻轻混匀放入培养箱中孵育 6 h, 进行换液 (含 10% FBS 的培养液), 继续培养 24 h。用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上裂解 30 min 后, 用细胞刮收集并转移至 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}$ C、13 500 r/min 离心 20 min。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, 室温封闭 2 h, TBST 洗膜后加入一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:3 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后显影。用 Image-J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算蛋白的相对表达量。

2.9 统计学分析

运用 GraphPad 8.0 软件进行统计学分析和绘图。实验均重复 3 次, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用独立样本 t 检验, 多组间数据比较采用多因素方差分析。

3 结果

3.1 HCT116/5-FU 细胞耐药性的鉴定及葫芦素 B 对 HCT116/5-FU 细胞耐药性的影响

如图 1-A 所示, 与 HCT116 细胞比较, HCT116/5-FU 细胞生长抑制率显著降低 ($P < 0.05$)。HCT116 细胞的 IC_{50} 为 1.805 mg/L, HCT116/5-FU 细胞的 IC_{50} 为 12.13 mg/L, 耐药倍数为 6.72, 证实了 HCT116/5-FU 细胞对 5-FU 产生了耐药性。如图 1-B 所示, 葫芦素 B 处理 48 h 对 HCT116/5-FU 细胞的耐药逆转效果最好, 因此, 后续实验采取的时间为 48 h。

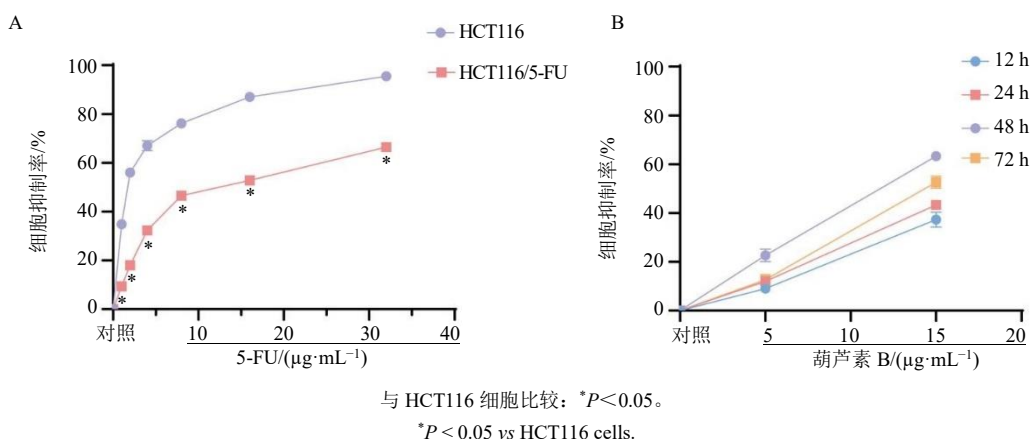


图 1 HCT116/5-FU 细胞耐药性的鉴定 (A) 及葫芦素 B 对 HCT116/5-FU 细胞耐药性的影响 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Identification of drug resistance in HCT116/5-FU cells (A) and effect of cucurbitine B on drug resistance in HCT116/5-FU cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 ENPP2 基因差异性表达及生存分析

如图 2 所示, 相较于 ENPP2 低表达组, ENPP2 高表达组患者生存率更低。

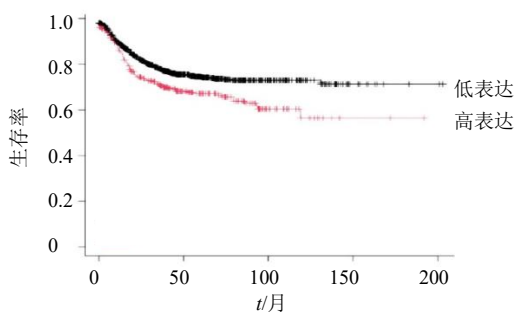


图 2 ENPP2 高表达和低表达的 Kaplan-Meier 生存曲线
Fig. 2 Kaplan-Meier curves of high and low expression levels of ENPP2

3.3 对 HCT116/5-FU 细胞中 ENPP2 表达及铁死亡的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 葫芦素 B 低、高剂量 (5、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组 ENPP2 表达显著降低 ($P < 0.01$), 且铁死亡标志物 GPX4 的表达显著降低, COX2 的表达显著增加 ($P < 0.01$)。

如图 4-A 所示, 葫芦素 B 可显著升高细胞内 Fe^{2+} 水平 ($P < 0.01$)。如图 4-B 所示, 葫芦素 B 显著增强了脂质过氧化水平 ($P < 0.01$)。此外, 与葫芦素 B 低剂量组比较, 葫芦素 B 高剂量对 ENPP2 的表达及其介导的铁死亡作用更加显著 ($P < 0.01$)。

3.4 ENPP2 过表达对 HCT116/5-FU 细胞耐药及铁死亡的影响

如图 5-A 所示, 与过表达阴性对照组 (over

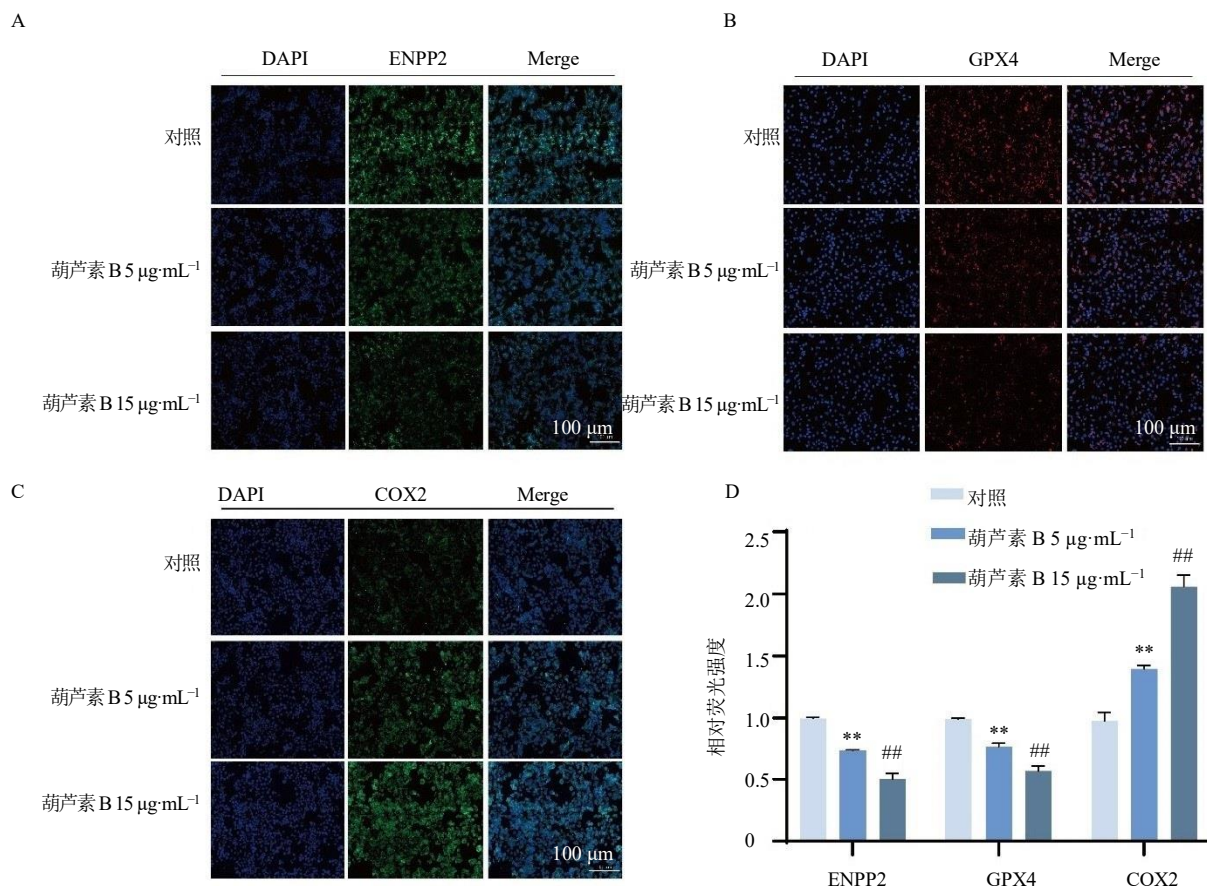
expression negative control, OE-NC) 组比较, OE-ENPP2 组细胞的 ENPP2 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 表明 ENPP2 过表达的 HCT116/5-FU 细胞构建成功。如图 5-B 所示, 与 OE-NC 组比较, OE-ENPP2 组细胞生长抑制率显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 6-A、B 所示, 采用 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葫芦素 B 处理细胞, 与 OE-NC 组比较, OE-ENPP2 组细胞中 Fe^{2+} 和脂质过氧化水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。如图 6-C、D 所示, 与 OE-NC 组比较, OE-ENPP2 组 GPX4 表达显著升高 ($P < 0.05$), COX2 表达显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

耐药性是导致结直肠癌治疗失败的主要原因之一, 因此, 寻找合适的耐药逆转剂对于改善患者预后至关重要^[14-15]。研究表明, 许多天然产物因其多种生物活性而展现出辅助治疗癌症的潜力, 其中, 葫芦素 B 在卵巢癌、肺癌、胃癌等多种癌症中具有潜在的治疗作用^[16], 并且葫芦素 B 能够增强癌症对现有化疗药物的敏感性, 如提高喉鳞状细胞癌对顺铂的敏感性^[17]。本研究发现, 葫芦素 B 可抑制结直肠癌耐药细胞的增殖, 且通过抑制 ENPP2 的表达调控铁死亡, 从而在结直肠癌耐药细胞中发挥作用。

由于中药来源广泛且成分繁多、应用途径多样以及作用靶点广泛, 越来越多的研究开始关注中药成分在逆转化疗耐药方面的作用。丘韶校等^[18]研究表明葫芦素 B 能够在人肺癌 A549 细胞中抗吉非替尼耐药。Zhang 等^[19]进一步发现, 葫芦素 B 能够调控 STAT3 通路抑制 A549 细胞的增殖并诱导其凋亡。



A~C-免疫荧光检测葫芦素 B 对细胞中 ENPP2、GPX4、COX2 蛋白表达的影响；D-ENPP2、GPX4、COX2 表达的免疫荧光检测结果的定量分析；与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与葫芦素 B 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较：# $P<0.05$ ## $P<0.01$ ，图 4 同。

A—C-immunofluorescence staining of ENPP2, GPX4, and COX2 protein in cells treated with cucurbitine B; D-quantitative analysis of ENPP2, GPX4 and COX2 expression by immunofluorescence detection; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs cucurbitine B 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, same as figure 4.

图 3 葫芦素 B 对 HCT116/5-FU 细胞中 ENPP2 及铁死亡相关标志物表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of cucurbitine B on expression of ENPP2 and ferroptosis-related markers in HCT116/5-FU cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

此外，还有研究指出葫芦素 B 还能通过触发内皮细胞中的线粒体信号通路来抑制肿瘤血管的生成^[20]。本研究结果显示，在结直肠癌耐药细胞株 HCT116/5-FU 中，葫芦素 B 以剂量相关的方式逆转了结直肠癌耐药细胞株 HCT116/5-FU 对 5-FU 的耐药性。STAT3 信号的异常活化及其下游基因 *ENPP2* 的过度表达已被证实可促进多种恶性肿瘤的发生发展^[21-22]，且阻断 STAT3 信号转导或抑制 *ENPP2* 表达可以逆转肿瘤细胞耐药^[23-24]。例如，ENPP2 及其产物溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 可促进乳腺癌的发生发展^[25]，而 ENPP2 抑制剂能够减少胃肠道癌症的进展^[26]。本研究发现，葫芦素 B 处理可以降低 HCT116/5-FU 细胞中的 ENPP2 表达，且过表达 ENPP2 可以逆转葫芦素 B 的抗耐药活性，提示葫芦素 B 的抑癌活性和抗耐药功能

可能与 ENPP2 相关。

肿瘤多药耐药的作用机制十分复杂，其中铁死亡降低是肿瘤产生耐药的原因之一^[27]。肿瘤细胞通过不同的途径降低细胞内 Fe^{2+} 水平，抑制脂质过氧化，减少细胞铁死亡，进而导致耐药性产生^[8]。天然产物双氢青蒿素通过抑制 GPX4 合成，增加体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量，从而诱导膀胱癌细胞发生铁死亡^[28]。在心肌细胞中，脂质代谢酶 ENPP2 能够通过调节 GPX4 等关键酶的表达，来抵抗铁死亡诱导的细胞损伤^[9]。本研究发现，葫芦素 B 通过抑制 GPX4 的表达并激活 COX2，促进 Fe^{2+} 的积累和脂质过氧化水平的升高，诱导 HCT116/5-FU 细胞铁死亡，这与前人的研究结果一致^[29]。此外，通过 ENPP2 过表达质粒转染 HCT116/5-FU 细胞发现，随着葫芦素 B 浓度的升高，HCT116/5-

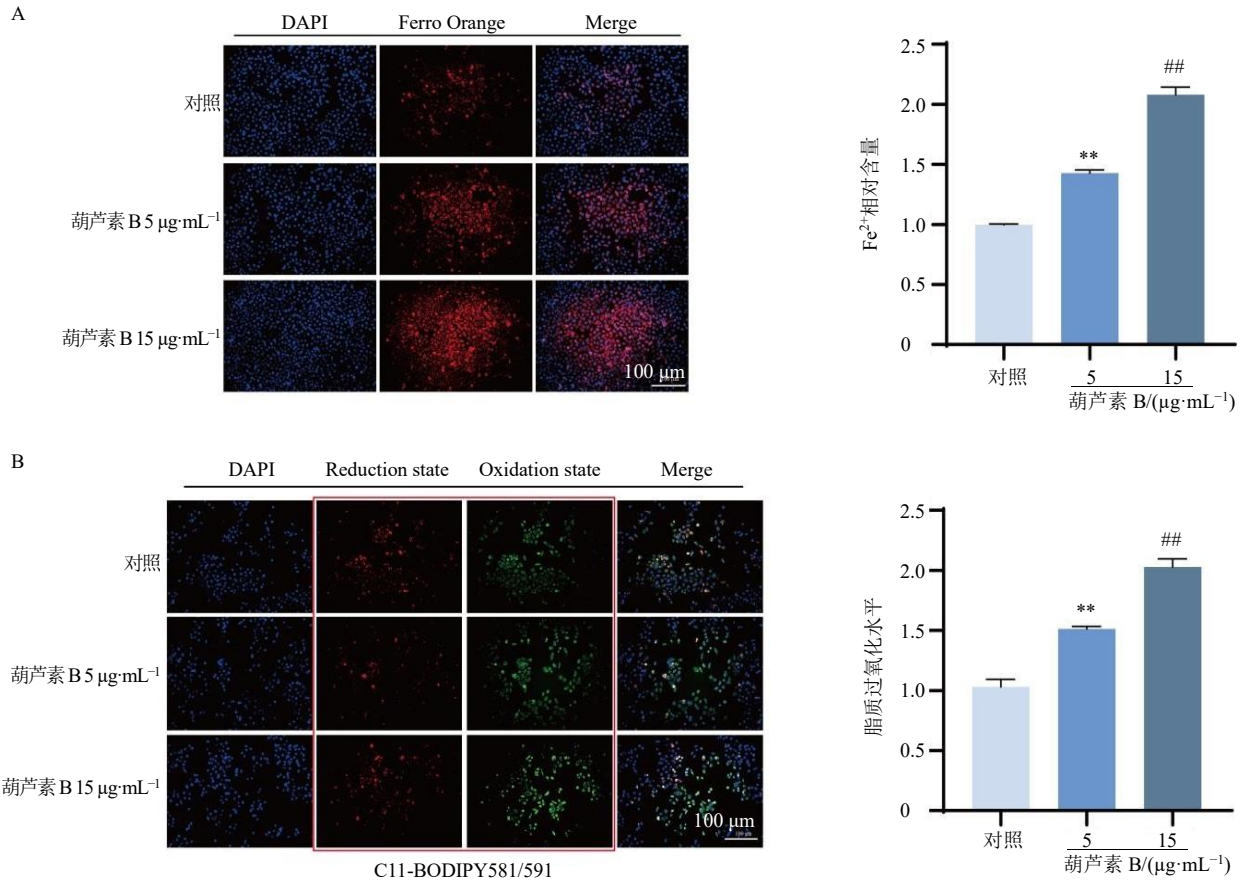
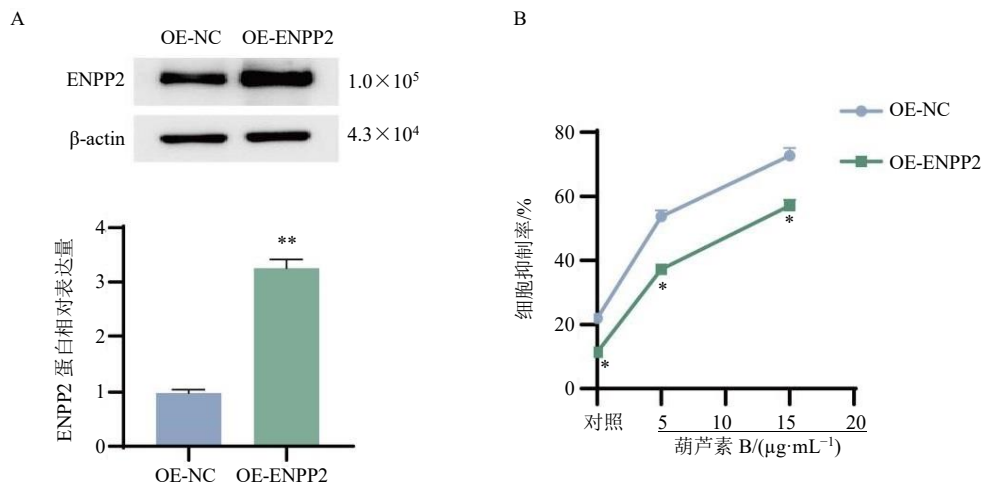


图 4 葫芦素 B 对 HCT116/5-FU 细胞中 Fe^{2+} 含量 (A) 和脂质过氧化水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of cucurbitine B on Fe^{2+} concentration (A) and lipid peroxidation levels (B) in HCT116/5-FU cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

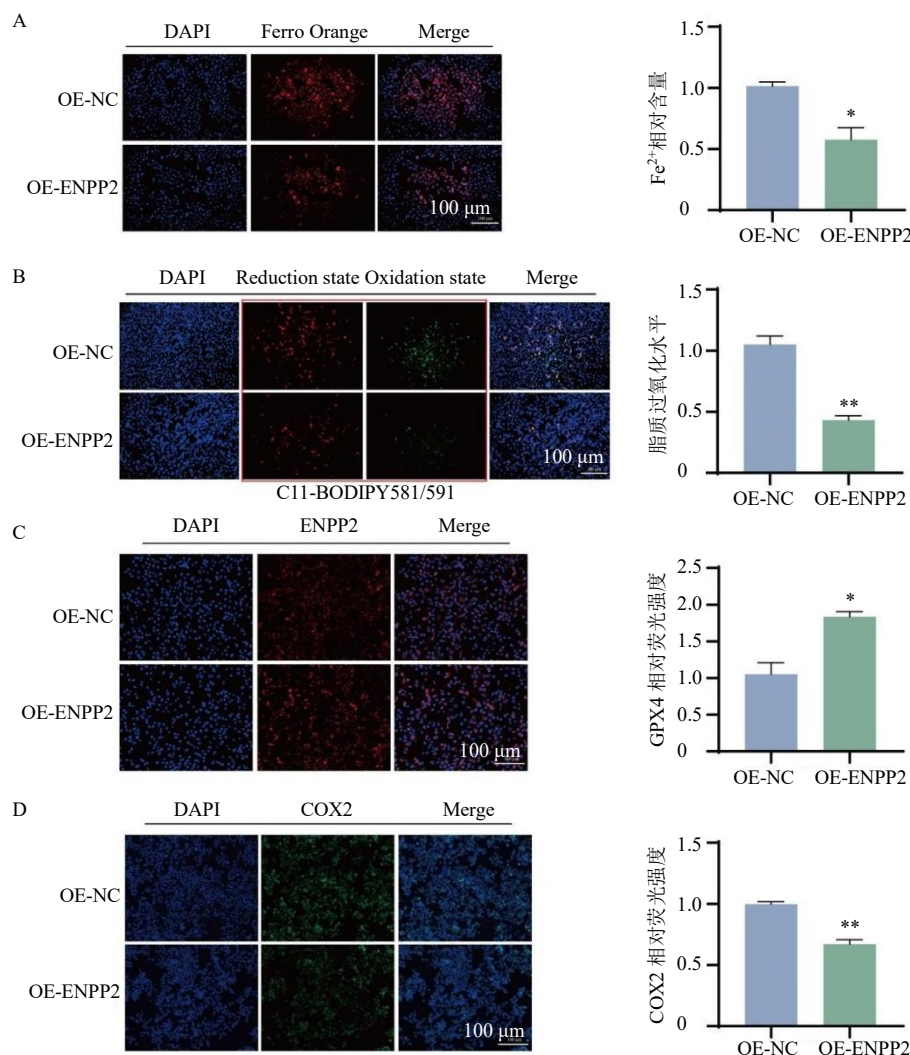


A-Western blotting 检测转染 48 h 后 HCT116/5-FU 细胞 ENPP2 的表达; B-CCK-8 检测葫芦素 B 对 ENPP2 过表达的 HCT116/5-FU 细胞的生长抑制率; 与 OE-NC 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 6 同。

A-Western blotting analysis of ENPP2 expression in HCT116/5-FU cells at 48 h post-transfection; B-growth inhibition rate of ENPP2-overexpressed HCT116/5-FU cells determined using CCK-8 assay; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs OE-NC group, same as figure 6.

图 5 葫芦素 B 对过表达 ENPP2 的 HCT116/5-FU 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of cucurbitine B on viability of HCT116/5-FU cells overexpressing ENPP2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-过表达 ENPP2 对 HCT116/5-FU 细胞中 Fe²⁺含量的影响；B-过表达 ENPP2 对 HCT116/5-FU 细胞中脂质过氧化物水平的影响；C、D-过表达 ENPP2 对 HCT116/5-FU 细胞中铁死亡相关蛋白表达的影响。

A- impact of ENPP2 overexpression on Fe²⁺ concentration in HCT116/5-FU cells; B-influence of ENPP2 overexpression on lipid peroxide levels in HCT116/5-FU cells; C, D-effect of ENPP2 overexpression on expression of ferroptosis-related proteins in HCT116/5-FU cells.

图 6 过表达 ENPP2 对 HCT116/5-FU 细胞铁死亡相关标志物的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Influence of ENPP2 overexpression on ferroptosis-related markers in HCT116/5-FU cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

FU 细胞的生长抑制率显著降低。同时，细胞内 Fe²⁺浓度以及脂质过氧化水平显著降低，而铁死亡标志蛋白 GPX4 表达显著升高，说明 ENPP2 即可逆转葫芦素 B 的作用并在结直肠癌的耐药机制中调控铁死亡。

综上，本研究初步揭示了葫芦素 B 通过影响 ENPP2 进而调控铁死亡影响结直肠癌耐药中的作用机制。未来仍需通过动物实验以及临床验证，进一步探讨葫芦素 B 在结直肠癌治疗中的潜在应用价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Chen G L, Gong T, Wang Z, *et al.* Colorectal cancer organoid

models uncover oxaliplatin-resistant mechanisms at single cell resolution [J]. *Cell Oncol*, 2022, 45(6): 1155-1167.

[2] Kurter H, Basbınar Y, Ellidokuz H, *et al.* The role of cyanidin-3-O-glucoside in modulating oxaliplatin resistance by reversing mesenchymal phenotype in colorectal cancer [J]. *Nutrients*, 2023, 15(22): 4705.

[3] Zhang H Y, Zhao B, Wei H Z, *et al.* Cucurbitacin B controls M2 macrophage polarization to suppresses metastasis via targeting JAK-2/STAT3 signalling pathway in colorectal cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 287: 114915.

[4] Liu J H, Li C, Cao L, *et al.* Cucurbitacin B regulates lung cancer cell proliferation and apoptosis via inhibiting the IL-6/STAT3 pathway through the lncRNA XIST/miR-let-7c axis [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 154-162.

- [5] Wu Y C, Pi D J, Zhou S Y, *et al.* Ginsenoside Rh₃ induces pyroptosis and ferroptosis through the Stat3/p53/Nrf2 axis in colorectal cancer cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2023, 55(4): 587-600.
- [6] Tsuchida Y, Shoda H, Nakano M, *et al.* Autotaxin is a potential link between genetic risk factors and immunological disturbances of plasmacytoid dendritic cells in systematic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2022, 31(13): 1578-1585.
- [7] Yan J L, Duan W T, Gao Q H, *et al.* ENPP2 inhibitor improves proliferation in AOM/DSS-induced colorectal cancer mice via remodeling the gut barrier function and gut microbiota composition [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 195: 106877.
- [8] 余志平, 何韶华, 谭力铭. 铁死亡与肿瘤耐药 [J]. *生命的化学*, 2024, 44(4): 710-718.
- [9] Fang G H, Shen Y M, Liao D S. ENPP2 alleviates hypoxia/reoxygenation injury and ferroptosis by regulating oxidative stress and mitochondrial function in human cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2023, 28(3): 253-263.
- [10] Hu B, Zheng J, Liu Q, *et al.* The effect and safety of ozone autohemotherapy combined with pharmacological therapy in postherpetic neuralgia [J]. *J Pain Res*, 2018, 11: 1637-1643.
- [11] Yang C, Song J, Hwang S, *et al.* Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells [J]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102144.
- [12] 赵秦英, 吴悦, 桂仲璇, 等. 华蟾素调控 HIF-1 α /VEGF 通路逆转结肠癌 HCT15/5-FU 细胞耐药的体外研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(6): 902-907.
- [13] Klein EY, Tseng KK, Pant S, *et al.* Tracking global trends in the effectiveness of antibiotic therapy using the drug resistance index [J]. *BMJ Glob Health*, 2019 11;4(2): e001315.
- [14] 杨柳, 彭飞, 陆平, 等. 当归多糖对结直肠癌细胞顺铂耐药性的影响及作用机制 [J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2024, 25(4): 448-453.
- [15] Yue Y Y, Zhang Q, Wang X Q, *et al.* STAT3 regulates 5-Fu resistance in human colorectal cancer cells by promoting Mcl-1-dependent cytoprotective autophagy [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(6): 2293-2305.
- [16] Luo H, Vong C T, Chen H B, *et al.* Naturally occurring anti-cancer compounds: Shining from Chinese herbal medicine [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 48.
- [17] Liu T Y, Peng H G, Zhang M X, *et al.* Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 641(1): 15-22.
- [18] 丘韶校, 曾超朋, 何臣, 等. 葫芦素 B 靶向抑制 STAT3 抗吉非替尼耐药非小细胞肺癌的研究 [J]. *中国现代医生*, 2019, 57(16): 34-37.
- [19] Zhang M, Bian Z G, Zhang Y, *et al.* Cucurbitacin B inhibits proliferation and induces apoptosis via STAT3 pathway inhibition in A549 lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(6): 2905-2911.
- [20] Piao X M, Gao F, Zhu J X, *et al.* Cucurbitacin B inhibits tumor angiogenesis by triggering the mitochondrial signaling pathway in endothelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 1018-1025.
- [21] Wu A H, Fang D Q, Liu Y Y, *et al.* Nuclear translocation of thioredoxin-1 promotes colorectal cancer development via modulation of the IL-6/STAT3 signaling axis through interaction with STAT3 [J]. *Theranostics*, 2023, 13(14): 4730-4744.
- [22] Long Y, Wang Y Q, Qu M X, *et al.* Combined inhibition of EZH2 and the autotaxin-LPA-LPA2 axis exerts synergistic antitumor effects on colon cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2023, 566: 216226.
- [23] Banerjee S, Norman D D, Lee S C, *et al.* Highly potent non-carboxylic acid autotaxin inhibitors reduce melanoma metastasis and chemotherapeutic resistance of breast cancer stem cells [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(4): 1309-1324.
- [24] Pore N, Wu S, Standifer N, *et al.* Resistance to durvalumab and durvalumab plus tremelimumab is associated with functional *STK11* mutations in patients with non-small cell lung cancer and is reversed by STAT3 knockdown [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(11): 2828-2845.
- [25] Liu S Y, Umez-Goto M, Murph M, *et al.* Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(6): 539-550.
- [26] Centonze M, Di Conza G, Lahn M, *et al.* Autotaxin inhibitor IOA-289 reduces gastrointestinal cancer progression in preclinical models [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 197.
- [27] Zhang C, Liu X Y, Jin S D, *et al.* Ferroptosis in cancer therapy: A novel approach to reversing drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 47.
- [28] 张海燕, 王欣, 李锦硕, 等. 铁死亡与肿瘤及肿瘤耐药的研究进展 [J]. *山西大同大学学报: 自然科学版*, 2023, 39(4): 86-90.
- [29] 刘致远, 曾瑾子, 郑桐煜, 等. 葫芦素 B 诱导人结直肠癌细胞铁死亡的分子机制研究 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45(8): 325-335.