

基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨雷公藤红素调控铁死亡抑制胃癌的作用机制

梁爽¹, 唐源^{1#}, 兰天¹, 蔺阳¹, 党春艳², 王瑞麟¹, 马玉秀¹, 潘海邦^{1*}, 李红玲^{2*}

1. 甘肃中医药大学第一临床医学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省人民医院, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 通过网络药理学、分子对接及实验验证探讨雷公藤红素通过调控铁死亡抑制胃癌的机制。方法 通过 TC MSP、SwissTargetPrediction 数据库收集药物作用靶点, Genecards、Drukbank、OMIM、TTD 及 Pharmgkb 数据库收集胃癌疾病作用靶点, 通过 jvenn 在线网站获取二者交集靶点, 通过 STRING 数据库及 Cytoscape 3.7.2 软件进行网络可视化, 利用 CytoNCA 插件及 CytoHubba 扩展程序计算节点得分, 获得 Hub 基因, 然后使用 R 软件进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能、基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 通过 FerrDb V2 数据库检索铁死亡相关靶点, 与药物-疾病靶点取交集获得核心靶点, 并根据度值大小初步确定雷公藤红素通过调控铁死亡治疗胃癌的作用靶点; 采用 SYBYL-X 2.0、RCSB、AutoDock Vina、Discovery Studio 等软件进行分子对接验证。体外培养人胃腺癌 AGS 细胞, 通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞活力; 通过克隆形成实验和 EdU 实验探讨雷公藤红素对胃癌细胞增殖能力的影响; 划痕实验和 Transwell 实验探讨雷公藤红素对细胞迁移能力的影响; 流式细胞术检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累水平; 荧光显微镜观察线粒体膜电位水平的变化; 试剂盒检测细胞内亚铁离子 (Fe^{2+})、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 (glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG) 水平; Western blotting 检测核心靶点及铁死亡相关蛋白表达情况。**结果** 共获得 124 个雷公藤红素靶点、2 343 个胃癌相关靶点, 取交集得到 89 个共有靶点。蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络筛选得到 10 个 Hub 基因。GO 功能富集分析显示, 雷公藤红素主要通过影响细胞增殖、转录、凋亡和氧化应激等来发挥功能, KEGG 通路富集分析显示, 雷公藤红素参与调控多条肿瘤相关信号通路。获得雷公藤红素-胃癌-铁死亡交集靶点 25 个, 结合度值大小及 PPI 得分确定信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 为雷公藤红素通过调控铁死亡治疗胃癌的核心作用靶点。分子对接结果提示, 雷公藤红素与 STAT3 有较好的结合活性。与对照组比较, 雷公藤红素组 AGS 细胞活力、克隆数量、EdU 阳性率、细胞迁移率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), ROS 水平明显升高 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位明显下降 ($P < 0.01$), MDA 及 Fe^{2+} 水平显著升高 ($P < 0.01$), GSH/GSSG 值显著降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。给予铁死亡抑制剂 (ferrostatin-1, Fer-1) 干预后显著逆转雷公藤红素对以上指标的作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 雷公藤红素通过调控 STAT3 诱导胃癌细胞铁死亡, 抑制胃癌细胞的恶性增殖及迁移。

关键词: 雷公藤红素; 胃癌; 网络药理学; 分子对接; 铁死亡; 信号转导和转录激活因子 3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2385-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.015

Mechanism of celastrol on inhibiting gastric cancer by regulating ferroptosis based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation

LIANG Shuang¹, TANG Yuan¹, LAN Tian¹, LIN Yang¹, DANG Chunyan², WANG Ruilin¹, MA Yuxiu¹, PAN Haibang¹, LI Hongling²

1. The First Clinical Medical School, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82460561); 甘肃省自然科学基金资助项目 (24JRRA586); 国家卫健委重点实验室硕博基金项目 (NHCDP2022005); 甘肃省人民医院内科研基金项目 (22GSSYD-38)

作者简介: 梁爽, 硕士研究生, 从事胃肠肿瘤相关研究。E-mail: 1017448414@qq.com

#共同第一作者: 唐源, 硕士研究生, 从事胃肠外科相关研究。E-mail: 2296964792@qq.com

***通信作者:** 李红玲, 教授, 博士, 主任医师, 从事肿瘤相关疾病研究。E-mail: lihongling1969@126.com

潘海邦, 副教授, 博士, 主任医师, 从事外科相关研究。E-mail: phwb@126.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of celastrol on inhibiting gastric cancer through regulating ferroptosis using network pharmacology, molecular docking and experimental validation. **Methods** Drug targets were collected from TCMSP and SwissTargetPrediction databases, while gastric cancer disease targets were obtained from Genecards, DrugBank, OMIM, TTD and PharmGKB databases. The intersection of these targets was identified using jvenn, followed by network visualization using STRING and Cytoscape 3.7.2 software. CytoNCA and CytoHubba plugins were used to calculate node scores and identify Hub genes. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using R software. Ferroptosis-related targets were retrieved from FerrDb V2, and the intersection with drug-disease targets was used to identify core targets. Molecular docking was carried out using SYBYL-X 2.0, RCSB, AutoDock Vina and Discovery Studio. AGS cells were cultured *in vitro*, and cell viability was measured using cell counting kit-8 (CCK-8). Cloning formation experiments and EdU experiments were used to investigate the effect of celastrol on cell proliferation. Scratch assays and Transwell assays were used to assess the effects of celastrol on cell migration. Flow cytometry was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) levels. Fluorescence microscopy was used to observe mitochondrial membrane potential (MMP) changes. Kits were used to measure the levels of Fe^{2+} , malondialdehyde (MDA) and glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG). Western blotting was performed to determine the expression levels of key target and ferroptosis-related proteins. **Results** A total of 124 potential targets for celastrol and 2 343 gastric cancer-related targets were identified. The intersection of these targets revealed 89 common targets. Protein-protein interaction (PPI) network analysis identified 10 Hub genes. GO function enrichment analysis showed that celastrol mainly exerted its effects by influencing cell proliferation, transcription, apoptosis and oxidative stress. KEGG pathway enrichment analysis showed that celastrol was involved in regulating multiple tumor-related signaling pathways. A total of 25 common targets between celastrol, gastric cancer and ferroptosis were identified, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) was determined as the core target through which celastrol regulateing ferroptosis in gastric cancer treatment based on docking score and PPI score. Molecular docking results indicated a strong binding affinity between celastrol and STAT3. Compared with control group, the viability, colony number, EdU positivity rate and cell migration rate of AGS cells in celastrol group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), ROS level was significantly increased ($P < 0.01$), MMP was significantly decreased ($P < 0.01$), levels of MDA and Fe^{2+} were significantly increased ($P < 0.01$), GSH/GSSG value was significantly decreased ($P < 0.01$), and showed a dose-dependent relationship. After intervention with ferrostatin-1 (Fer-1), the effects of celastrol on the above indicators were significantly reversed ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Celastrol induces ferroptosis in gastric cancer cells by regulating STAT3, inhibiting malignant proliferation and migration of gastric cancer cells.

Key words: celastrol; gastric cancer; network pharmacology; molecular docking; ferroptosis; signal transducer and activator of transcription 3

胃癌是全球第 5 大癌症,也是全球第 4 大癌症死亡原因,死亡率极高。最新统计数据显示,2020 年全球胃癌新发病人数 108.91 万人,死亡人数 76.88 万人,全球胃癌发病率为 0.176%。我国胃癌发病率为 0.331 4%,死亡率为 0.243 4%,发病率和死亡率均位居世界第 2^[1]。高发病率和高致死率使胃癌成为我国癌症研究和防治的重点领域。由于我国肿瘤早筛率较低,大多数胃癌患者在确诊时已处于晚期,错失手术根治的机会,这也是导致患者 5 年内生存率较低的主要原因^[2]。对于进展期胃癌,目前的主要治疗手段包括化疗、免疫治疗和靶向治疗^[3]。然而,这些治疗手段存在不良反应大、患者耐受性差等问题。此外,胃癌的高度异质性进一步限制了现有治疗的疗效,许多患者对传统疗法表现出较低的敏感性,导致治疗效果不尽理想。尽管近年来胃癌的治疗在免疫和靶向治疗领域取得了一

定进展,但改善患者预后仍面临诸多挑战。因此,开发更有效、毒性更低的新治疗策略以延长患者生存期、提高生活质量,显得尤为重要。探索潜在的药物靶点及新的药物治疗方案不仅对提高治疗效果具有重要意义,也将为解决我国胃癌防治难题提供新思路。

铁死亡是 Dixon 在 2012 年首次定义的一种新型细胞死亡形式,其关键特征是线粒体嵴的减少或消失、铁蓄积和氧化还原谷胱甘肽系统的消耗以及脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累,其作用可以被铁螯合剂和抗氧化剂抑制逆转^[4]。诱导肿瘤细胞铁死亡是一种新的肿瘤治疗策略,许多中药小分子可以促进细胞铁死亡,为肿瘤治疗提供新的策略。

中药是我国古代用来治疗疾病的主要方法,其生物活性成分在多种疾病中展现了多样化的治疗

特性,包括炎症、肥胖、癌症和细菌性疾病等^[5]。由于其成分、靶点和作用途径的多样性,以及安全性和其他特性,中药近年来受到越来越多的关注^[6]。许多中药小分子成分已被用于癌症的预防和治疗,并展现出独特的优势^[7]。这些中药小分子可通过抑制肿瘤生长、诱导细胞凋亡、诱导细胞自噬和逆转耐药性等多种途径发挥抗癌作用^[7]。近年来的研究表明,一些中药活性成分可以通过诱导肿瘤细胞铁死亡来调控肿瘤的恶性进程。双氢青蒿素诱导肝癌细胞铁死亡^[8];姜黄素诱导肺癌细胞铁死亡^[9];槲皮素诱导胃癌细胞铁死亡^[10];氧化苦参碱诱导肝癌细胞铁死亡^[11]等。以上研究结果表明,中药小分子在基于铁死亡的肿瘤治疗中具有巨大的潜力。

雷公藤红素是从卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根皮提取的一种有效的草本单体成分。据报道,雷公藤红素具有抗肿瘤、抗炎、治疗自身免疫、肥胖和神经退行性疾病等药理活性^[12]。目前,关于雷公藤红素的众多研究发现,其对包括肾癌^[13]、肝癌^[14]、胃癌^[15]、前列腺癌^[16]在内的多种肿瘤都具有抗癌活性。雷公藤红素可以通过诱导细胞凋亡、自噬、铁死亡、调节细胞周期及抑制血管生成等途径来抑制肿瘤的恶性表型^[17],然而,雷公藤红素在胃癌中的作用机制是否与铁死亡有关,目前尚未明晰。据此,本研究通过网络药理学、分子对接和体外实验研究雷公藤红素对胃癌的影响及其作用机制,为其临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株

人胃癌 AGS 细胞获赠于甘肃省人民医院转化研究所,取第 10 代细胞用于实验。

1.2 药品与试剂

雷公藤红素(质量分数 $\geq 98\%$,批号 DL0035)购自成都乐美天医药科技有限公司;铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1,批号 M2698)、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8,批号 M4839)购自上海奥默生物技术有限公司;RPMI 1640 培养基(批号 L210KJ)、青霉素-链霉素双抗溶液(批号 S110JV)购自上海源培生物科技股份有限公司;胎牛血清(批号 11011-8611)购自浙江天杭生物科技股份有限公司;PBS 缓冲液(批号 P1010-2L)购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司;结晶紫染色液(批号 G1062)购自北京索莱宝技术有限公司;EdU-

594 细胞增殖、检测试剂盒(批号 C0078S)、线粒体膜电位检测试剂盒(批号 C2001S)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号 S0131S)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)检测试剂盒(批号 S0053)均购自上海碧云天生物科技股份有限公司;ROS 检测试剂盒(批号 MA0219)购自大连美仑生物技术有限公司;细胞亚铁比色法试剂盒(批号 E-BC-K881)购自甘肃伟博鑫生物科技有限公司;信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体(批号 T55292)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体(批号 T56959)、溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗体(批号 T57054)购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 10494-1-AP)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

ix71 型倒置荧光生物显微镜(日本 Olympus 公司);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);WD-9405FN 型脱色摇床(北京六一生物科技有限公司);BD Accuri C6 Plus 型流式细胞分析仪(美国 BD 公司);ChemiDoc XRS⁺型凝胶成像系统、PowerPac Basic 型电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra 型电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学和分子对接

2.1.1 雷公藤红素靶点预测 通过 TCMSP 数据库获得雷公藤红素的结构文件,将文件导入 SwissTargetPredicyion 数据库,以预测概率(probability) >0 筛选药物的作用靶点。通过 BATMAN-TCM 2.0 数据库以评分阈值(score cutoff) >0.84 为阈值筛选药物的靶点;将上述数据库收集的靶点合并后删除重复项,获得雷公藤红素预测靶点。

2.1.2 胃癌靶点预测 以“gastric cancer”为关键词,分别在 Drugbank 数据库、GeneCards 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库、PharmGkb 数据库对胃癌潜在靶点进行预测,以相关性评分(relevance score) >10 筛选靶点。随后,利用 jvenn 在线网站

(<https://www.bioinformatics.com.cn>) 对预测靶点进行交集分析, 并将交集结果与药物靶点数据集进一步取交集, 筛选获得药物-疾病靶点, 绘制 Venn 图。

2.1.3 构建药物-疾病-靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络 将“2.1.2”项下得到的雷公藤红素-胃癌交集靶点输入至 STRING 数据库, 将物种设置为“Homo sapiens”, 并设置最低交互分数 (minimum required interaction score) 为 0.4, 随后, 下载 tsv 文件, 导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化处理。利用 CytoNCA 插件进行网络拓扑结构分析, 并使用 CytoHubba 扩展程序计算节点得分, 应用 MCC 算法获得 Hub 基因。

2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及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 使用 R 语言的“ggplot2”等 R 包, 对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。以 $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2.1.5 分子对接 从 PubChem 数据库下载配体的三维结构, 并通过 SYBYL-X 2.0 软件进行优化。受体的三维结构来源于 RCSB 数据库, 并使用 mgltools_win32_1.5.6 软件移除水分子和金属离子。利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件评估化合物与目标蛋白之间的结合亲和力, 并通过 Discovery Studio 对接结果进行可视化展示。

2.2 实验验证

2.2.1 CCK-8 实验检测细胞活力 AGS 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数生长期的 AGS 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 设置空白组 (不含细胞), 培养 24 h。细胞贴壁后, 分别加入 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素, 对照组加入不含药物的培养液, 每组 6 个复孔, 分别于培养 24、48、72 h 加入 10% CCK-8 溶液, 使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

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

2.2.2 克隆形成实验与 EdU 实验检测细胞增殖 取对数生长期的 AGS 细胞, 按 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。细胞贴壁后, 去除旧培养基, 设置对照组和雷公藤红素低、高剂量 (4、6 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组 3 个复孔, 培养 15 d 后去上清, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染液染色 20 min, 缓慢冲洗染色液, 室温干燥, 于倒置显微镜下计数大于 50 个细

胞的克隆集落数, 并计数形成的集落数。

取对数生长期的 AGS 细胞, 以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。细胞贴壁后, 去除旧培养基, 设置对照组和雷公藤红素低、高剂量 (4、6 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组 3 个复孔, 药物干预 24 h 后进行染色, 染色前 2 h 加入 EdU 试剂标记细胞, 多聚甲醛固定液固定细胞, 使用细胞通透液进行细胞破膜处理, 根据说明书配制 click reaction buffer, 每孔加入 500 μL 后室温避光孵育 30 min, 用 Hoechst 染料进行核染色, 采用荧光显微镜进行观察拍照。

2.2.3 划痕实验与 Transwell 实验检测细胞迁移 将对数生长期的 AGS 细胞, 以 5×10^4 个/孔接种至 6 孔板中, 细胞分组同“2.2.2”项, 待细胞呈单层融合时, 用 20 μL 无菌枪头在孔底划线, PBS 洗涤后分别给予相应药物, 于 37 °C 培养箱中继续孵育, 分别在显微镜下观察培养 24、48 h 细胞迁移情况, 计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (\text{0 h 划痕宽度} - \text{24 h 或 48 h 划痕宽度}) / \text{0 h 划痕宽度}$$

取对数生长期的 AGS 细胞, 用无血清培养基将 AGS 细胞制成细胞悬液, 调整细胞密度至 2.5×10^5 个/mL, 吸取 200 μL 接种于小室, 细胞分组同“2.2.2”项, 将小室放入 24 孔板, 在 24 孔板的下室加入 600 μL 含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C 培养箱孵育 24 h。移除小室后, 用棉签擦拭小室上层细胞, 4% 多聚甲醛固定后结晶紫染色 30 min。在显微镜下随机选择 5 个视野拍照观察。

2.2.4 流式细胞仪检测细胞 ROS 水平 取对数生长期的 AGS 细胞, 以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 设置对照组及雷公藤红素低、高剂量 (4、6 $\mu\text{mol/L}$) 组和雷公藤红素 (6 $\mu\text{mol/L}$) + Fer-1 (2 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组 3 个复孔, 雷公藤红素 + Fer-1 组用 Fer-1 预处理细胞 24 h 后, 再用 6 $\mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素处理细胞 24 h。干预 24 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 使用 1 : 1 000 稀释的 DCFH-DA 工作液 (10 $\mu\text{mol/L}$) 重悬细胞, 37 °C 避光孵育 30 min, 随后流式细胞仪上机检测 ROS 水平。

2.2.5 TMRE 探针染色观察线粒体膜电位改变 取对数生长期的 AGS 细胞, 以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。细胞贴壁后, 去除旧培养基, 细胞分组同“2.2.4”项, 给药孵育 24 h 后, PBS 洗涤细胞, 加入 TMRE 试剂, 37 °C 避光孵育 30 min, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.6 细胞内 MDA 含量的检测 取对数生长期的 AGS 细胞，以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。细胞贴壁后，去除旧培养基，细胞分组同“2.2.4”项，给药孵育 24 h 后，PBS 洗涤细胞并收集，根据说明书使用细胞裂解液于冰上裂解， $10\,000 \times g$ 离心 10 min，对上清液进行 BCA 蛋白定量，随后取上清液按说明书检测细胞内 MDA 含量。

2.2.7 细胞内 Fe^{2+} 含量的检测 取对数生长期的 AGS 细胞，以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。细胞贴壁后，去除旧培养基，细胞分组同“2.2.4”项，给药孵育 24 h 后，PBS 洗涤细胞并收集，根据说明书于冰上裂解 10 min， $15\,000 \times g$ 离心 10 min，取上清液按试剂盒说明书检测细胞内 Fe^{2+} 含量。

2.2.8 细胞内 GSH 和 GSSG 含量的检测 取对数生长期的 AGS 细胞，以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。细胞贴壁后，去除旧培养基，细胞分组同“2.2.4”项，给药孵育 24 h 后，PBS 洗涤细胞并收集，将细胞转移至 1.5 mL EP 管，根据试剂盒说明书去除蛋白，随后通过反复冻融进行裂解， $10\,000 \times g$ 、 $4\,^{\circ}C$ 离心 10 min。取上清液按说明书检测细胞内 GSH 及 GSSG 含量，并计算 GSH/GSSG 值。

2.2.9 Western blotting 检测铁死亡相关蛋白表达 取对数生长期的 AGS 细胞，以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板。按“2.2.6”项下方法处理，药物干预 24 h 后收集细胞，加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液进行裂解，30 min 后 $12\,000\text{ r/min}$ 离心 15 min，取上清进行 BCA 法蛋白定量。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，用 5% 的脱脂奶粉溶液封闭膜后，分别滴加一抗， $4\,^{\circ}C$ 孵

育过夜，洗膜 3 次后，加入二抗孵育。利用凝胶成像系统拍摄条带图像，并通过 Image-J 软件测定条带灰度值，计算目标蛋白的相对表达量。

2.3 统计学分析

使用 GraphPad 8.0.1 统计软件进行数据分析，所有实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的差异通过 t 检验评估，多组数据则采用单因素方差分析。

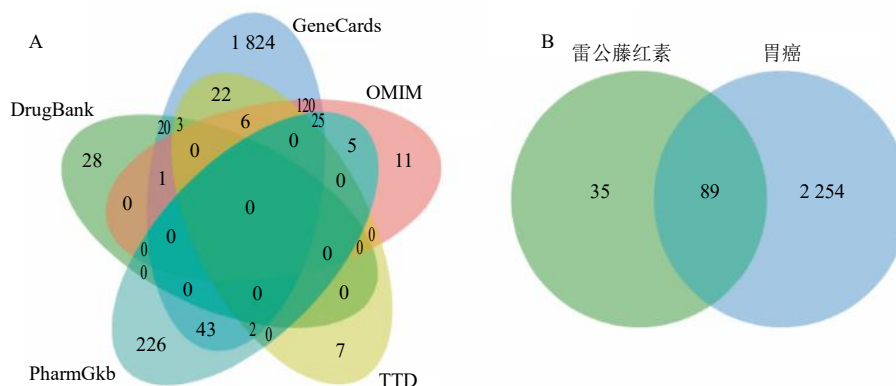
3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 雷公藤红素靶点预测 通过 TCMSP 数据库获取雷公藤红素的化合物结构，将其导入 SwissTargetPrediction 数据库获得雷公藤红素靶点，共得到 100 个靶点；再通过 BATMAN-TCM 2.0 数据库筛选出 107 个靶点；将上述数据库收集的靶基因合并后删除重复项，共获得 124 个雷公藤红素可能的作用靶点。

3.1.2 雷公藤红素与胃癌共同靶点筛选 如图 1 所示，通过 GeneCards 数据库筛选得到胃癌相关基因 2 066 个，Drugbank 数据库得到相关基因 52 个，OMIM 数据库得到相关基因 168 个，PharmGkb 数据库得到相关基因 301 个，TTD 数据库得到相关基因 40 个，合并去重后共得到 2 343 个胃癌相关基因，将其与 124 个药物靶基因取交集获得交集基因 89 个，即为雷公藤红素抗胃癌的潜在靶基因。

3.1.3 雷公藤红素与胃癌相关靶点 PPI 网络分析 将雷公藤红素抗胃癌的潜在靶基因导入 STRING 数据库，构建 PPI 网络；应用 MCC 算法对 Hub 核心靶点进行分析筛选，得出排名前 10 的核心靶点，可能为雷公藤红素治疗胃癌的主要靶点，见图 2。



A-不同数据库中胃癌相关的靶基因；B-雷公藤红素靶基因与胃癌靶基因的 Venn 图。

A-gastric cancer-related target genes in different databases; B-Venn diagram of target genes of celestrol and gastric cancer.

图 1 药物-疾病靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of drug-disease target

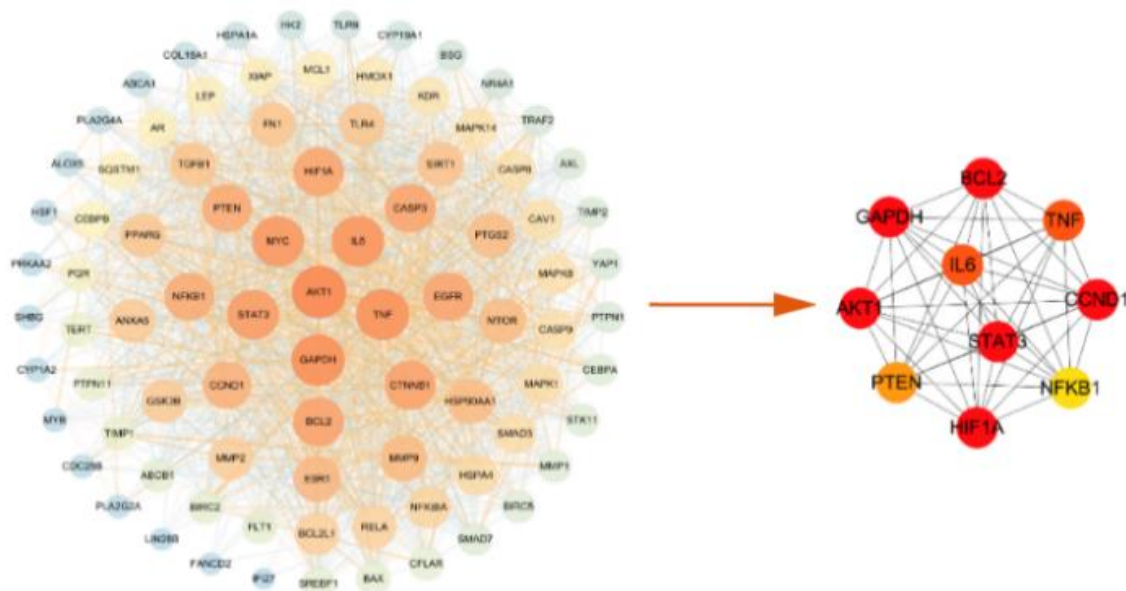


图 2 雷公藤红素治疗胃癌交集靶点 PPI 网络分析图

Fig. 2 PPI network analysis of intersecting targets between celastrol treatment and gastric cancer

3.1.4 GO 和 KEGG 富集分析 R 软件进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,发现雷公藤红素治疗胃癌的靶点影响了 3 994 个生物过程 (biological process, BP)、226 个细胞组成 (cellular component, CC)、378 个分子功能 (molecular function, MF),选取排名前 10 的条目进行可视化分析,见图 3-A。涉及的 BP 主要涉及对上皮细胞增殖调控 (regulation of epithelial cell proliferation)、对化学压力的反应 (cellular response to chemical stress)、对氧化应激的反应 (cellular response to oxidative stress)、外源性细胞凋亡通路 (extrinsic apoptotic signaling pathway)、DNA 结合转录因子的调控 (regulation of DNA-binding transcription factor activity) 等,CC 主要涉及膜微结构域 (membrane microdomain)、膜筏 (membrane raft)、核被膜 (nuclear envelope)、细胞器外膜 (organelle outer membrane)、线粒体外膜 (mitochondrial outer membrane) 等,MF 则主要包括 DNA 结合转录因子结合 (DNA-binding transcription factor binding)、泛素样蛋白连接酶结合 (ubiquitin-like protein ligase binding)、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合 (RNA polymerase II-specific DNA-binding transcription factor binding)、激素受体结合 (hormone receptor binding) 等。KEGG 通路富集分析中,共检出显著性条目 226 个 ($P < 0.05$),其中与肿瘤相关的通路有 5 条,分别为白细胞介素-17 (interleukin-

17, IL-17) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、凋亡、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路。表明雷公藤红素可能通过这些信号通路发挥抑制胃癌的作用,见图 3-B。

3.1.5 雷公藤红素治疗胃癌与铁死亡相关基因的交集 通过 FerrDb V2 数据库下载铁死亡相关靶点,与药物-疾病靶点取交集获得核心靶点,对该交集进行 PPI 分析后,结合度值大小及药物-疾病相关靶点 PPI 网络分析得出的前 10 个 Hub 基因的得分,初步推测 STAT3 可能为雷公藤红素通过调控铁死亡治疗胃癌的核心靶点,见图 4。

3.1.6 雷公藤红素与关键靶点的分子对接 将 STAT3 蛋白与雷公藤红素进行分子对接,结合能为 -7.9 kJ/mol ,认为受体和配体有强烈的结合活性^[18],表明 STAT3 可与雷公藤红素形成稳定对接结构,见图 5。

3.2 细胞实验结果

3.2.1 雷公藤红素对 AGS 细胞活力的影响 与对照组比较,雷公藤红素对 AGS 细胞表现出明显的增殖抑制作用,并呈一定的时间及剂量相关性 ($P < 0.05$ 、 0.01),见图 6。作用 24 h 后, $4 \mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素作用下细胞活力约为 50%,因此选择 4 、 $6 \mu\text{mol/L}$ 雷公藤红素处理细胞 24 h 进行后续实验。

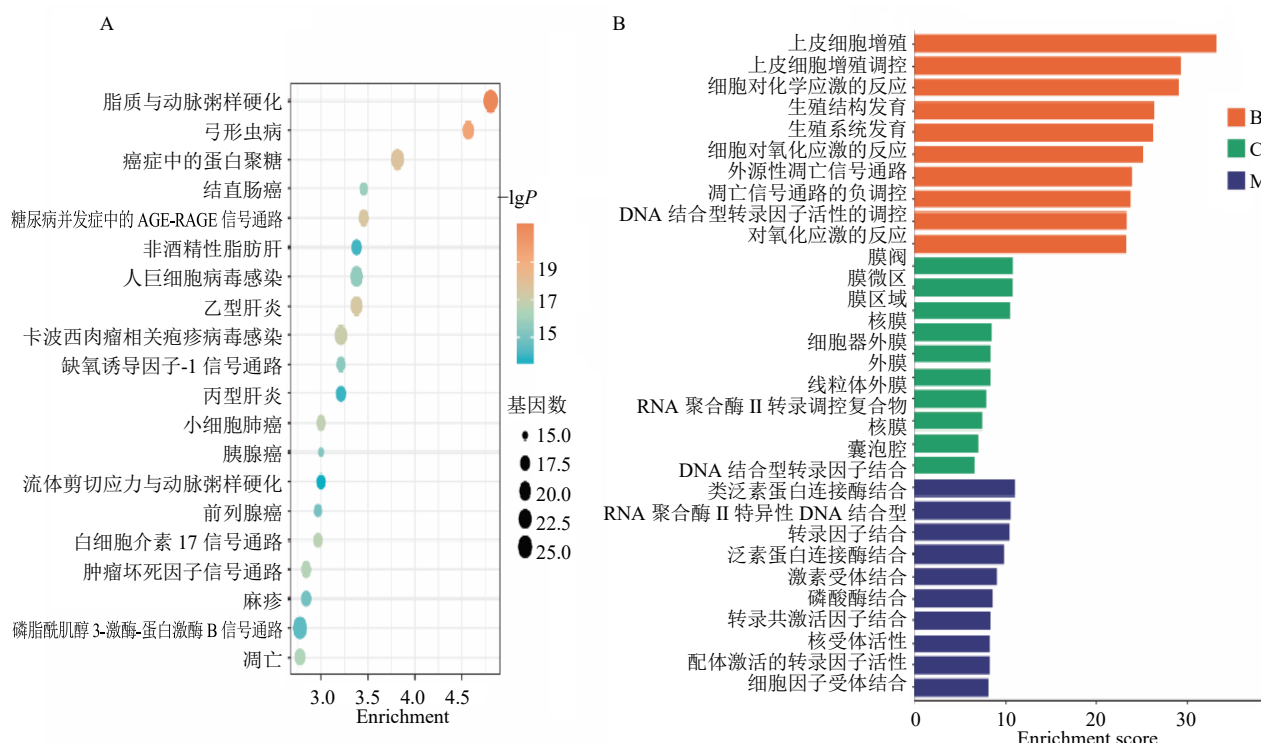


图 3 GO 功能 (A) 与 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 3 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis

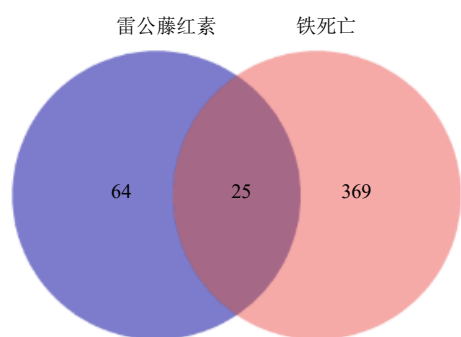
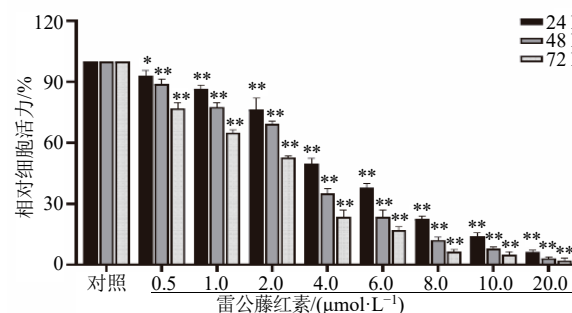


图 4 药物-疾病-铁死亡相关靶点 Venn 图

Fig. 4 Venn diagram of drug-disease-ferroptosis-related target



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below figures.

图 6 雷公藤红素对 AGS 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of celastrol on viability of AGS cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

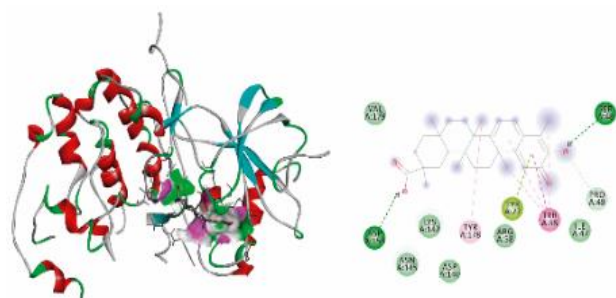
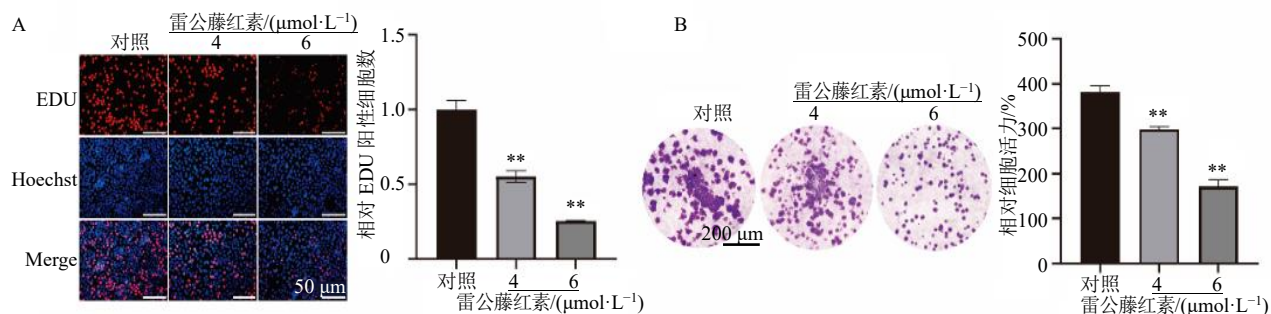


图 5 雷公藤红素与 STAT3 对接结果

Fig. 5 Molecular docking results of celastrol with STAT3

3.2.2 雷公藤红素对 AGS 细胞增殖的影响 与对照组比较, 雷公藤红素组 AGS 细胞增殖细胞数量显著减少 ($P < 0.01$), 见图 7-A。与对照组比较, 雷公藤红素组 AGS 细胞集落数显著减少 ($P < 0.01$), 见图 7-B。提示雷公藤红素可抑制 AGS 细胞的增殖, 且具有剂量相关性。

3.2.3 雷公藤红素对 AGS 细胞迁移的影响 与对照组比较, 雷公藤红素组 AGS 细胞划痕愈合率减少 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性, 见图 8-A; Transwell 小室的 AGS 细胞数量显著减少 ($P < 0.01$), 见图

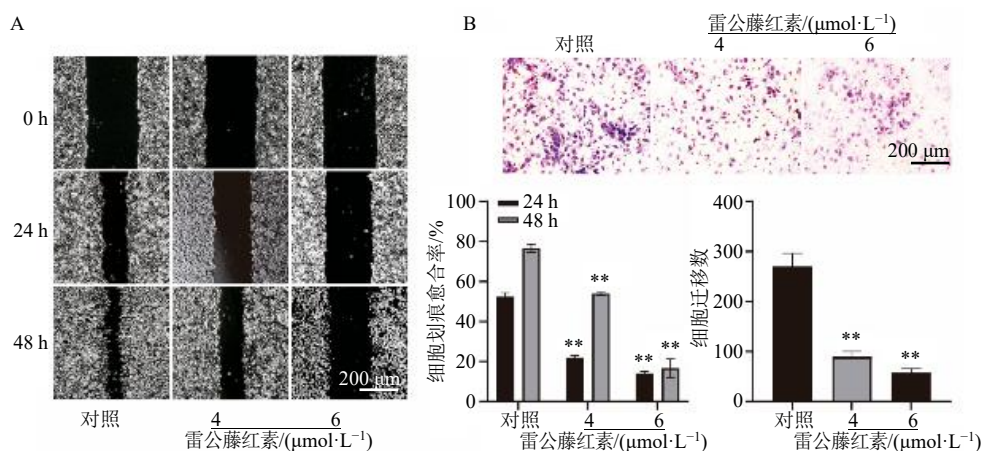


A-EdU 实验检测细胞增殖, 红色为 EdU 标记的增殖细胞, 蓝色为 DAPI 标记的活细胞; B-克隆形成实验评估细胞增殖能力。

A-cell proliferation detected by EdU assay, proliferating cells were labeled in red by EdU, while live cells were marked in blue by DAPI; B-cell proliferation detected by colony formation assay.

图 7 雷公藤红素对 AGS 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of celastrol on proliferation of AGS cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-划痕实验; B-Transwell 实验。

A-scratch assay; B-Transwell assay.

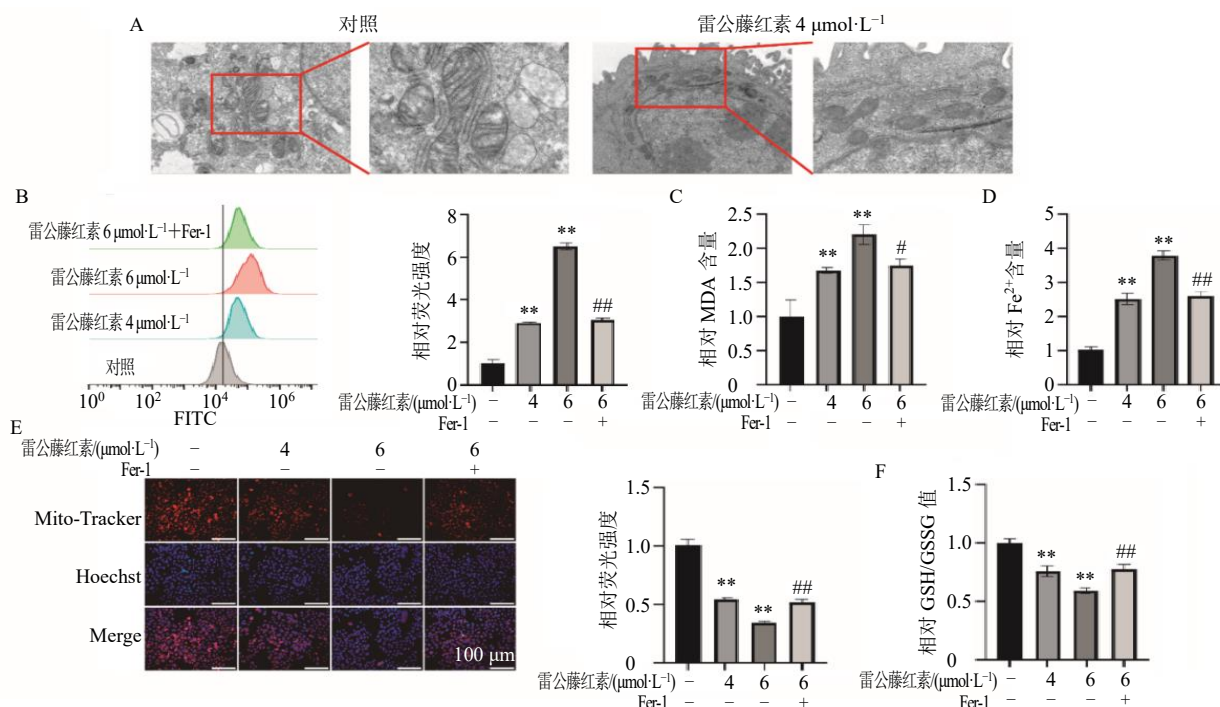
图 8 雷公藤红素对 AGS 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of celastrol on migration of AGS cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

8-B, 表明雷公藤红素能够抑制 AGS 细胞的迁移。

3.2.4 雷公藤红素诱导 AGS 细胞发生铁死亡 如图 9-A 所示, 对照组细胞线粒体结构完整、形态规则, 膜结构饱满、密度均匀; 雷公藤红素($4 \mu\text{mol/L}$)干预后, 线粒体表现出皱缩变形、密度增高以及嵴减少等变化, 提示雷公藤红素能够破坏 AGS 细胞的线粒体功能, 并与铁死亡的发生有关。如图 9-B~F 所示, 与对照组比较, 雷公藤红素($4, 6 \mu\text{mol/L}$)处理后, 细胞内 ROS、 Fe^{2+} 和 MDA 水平均显著升高 ($P < 0.01$), 而线粒体膜电位和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$); 给予铁死亡抑制剂 Fer-1 干预后, 上述指标均有所回调 ($P < 0.05, 0.01$)。结果表明, 雷公藤红素可能通过增加细胞内铁离子和 ROS 水平, 导致过氧化物积累及抗氧化物减少, 从而诱导 AGS 细胞发生铁死亡, 而该过程可以被 Fer-1 逆转。

网络药理学分析确定了雷公藤红素诱导铁死亡治疗胃癌的关键靶点 STAT3。作为氧化应激相关的转录因子, STAT3 与铁死亡密切相关。GPX4 和 SLC7A11 是铁死亡过程中的关键负调控因子。GPX4 防止氧化应激引起的细胞损伤, 而 SLC7A11 是系统 xCT 的核心组成部分, 可转运胞外胱氨酸生成 GSH, 维持细胞氧化还原平衡并参与 GPX4 的合成^[19-20]。为了明确雷公藤红素通过调控 STAT3 诱导胃癌细胞铁死亡的机制, 进一步检测了雷公藤红素对 STAT3、GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达的影响。如图 10 所示, 与对照组比较, 雷公藤红素显著下调了 STAT3 的表达 ($P < 0.01$)。STAT3 的下调进一步抑制了其对 GPX4 和 SLC7A11 的转录激活作用, 显著降低了二者的蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。GPX4 和 SLC7A11 表达的降低削弱了细胞的抗氧



A-各组细胞线粒体形态; B-流式细胞术检测 ROS 水平; C、D、F-MDA、 Fe^{2+} 、GSH 水平; E-使用 TMRE 探针观察线粒体膜电位水平; 与 $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雷公藤红素组比较: $^{*}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ 。

A-mitochondrial morphology in each group; B-ROS level in each group detected by flow cytometry; C, D, F-levels of MDA, GSH and Fe^{2+} ; E-mitochondrial membrane potential level observed by TMRE probe; $^{*}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ celastrol group.

图 9 雷公藤红素诱导 AGS 细胞发生铁死亡 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Celastrol induces ferroptosis in AGS cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

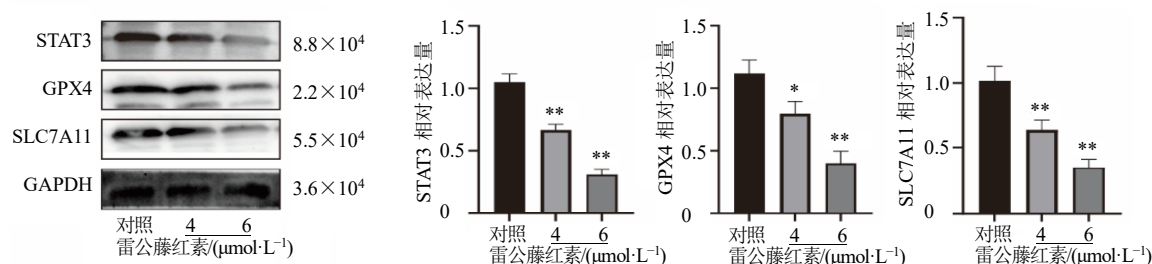


图 10 雷公藤红素对铁死亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of celastrol on expressions of ferroptosis-related proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化防御系统, 导致脂质过氧化物积累及细胞内氧化应激水平的升高, 从而诱导 AGC 细胞铁死亡。

4 讨论

目前, 我国胃癌发病率和死亡率均高于全球平均水平^[21]。不健康的生活习惯(如不规律的饮食模式、吸烟、饮酒和盐摄入过量)显著增加了胃癌的风险。尽管对胃癌的预防和治疗认识不断提高, 但由于早期发现率低, 晚期患者死亡率依然居高不下。因此, 开发更安全、有效的治疗药物是当前亟需解决的关键问题。

近年来, 中药在肿瘤治疗中的潜在价值逐渐得

到关注。研究表明, 中药具有“多成分、多靶点、多途径”的特点^[22]。雷公藤红素作为一种传统中药提取物, 因其低毒性、多靶点和广谱抗癌特性, 近年来备受关注^[23]。然而, 雷公藤红素在胃癌治疗中的具体机制, 及其与铁死亡的关系目前尚不明确。本研究结合网络药理学、分子对接和体外实验, 系统地探讨了雷公藤红素治疗胃癌的潜在机制。

网络药理学研究结果表明, 雷公藤红素可能调控细胞增殖、氧化应激和细胞凋亡等过程, 促进胃癌的发展, 且涉及的信号通路包括 IL-17、TNF、HIF-1 和 PI3K-Akt 通路等。此外, 药物-疾病靶点与铁

死亡相关基因的交集分析表明,雷公藤红素可能通过调控 STAT3 参与铁死亡,从而发挥抗胃癌作用。

铁死亡作为一种铁依赖的程序性细胞死亡形式,与氧化应激密切相关^[24]。肿瘤细胞因其高氧化应激水平而更易发生铁死亡^[25],因此诱导铁死亡被认为是一种潜在的抗癌策略。已有研究表明,雷公藤红素作为一种新型铁死亡诱导剂,通过改变细胞内铁代谢,增加铁离子水平,进一步通过催化芬顿反应产生大量 ROS,从而导致脂质过氧化、细胞膜破坏和最终的细胞死亡^[26]。雷公藤红素可通过抑制核糖核苷酸还原酶催化亚基-M2 诱导肝癌细胞铁死亡^[27],或通过谷胱甘肽 S-转移酶 Mu-1 (glutathione S-transferase Mu-1, GSTM1) 诱导肝癌细胞的铁死亡进而抑制其增殖^[28]。雷公藤红素还可以通过促进 GPX4 泛素化降解,诱导胰腺癌细胞的铁死亡^[29]。本研究通过体外实验验证了网络药理学分析结果,并进一步揭示了雷公藤红素通过诱导 AGS 细胞铁死亡从而抑制其增殖及迁移。Western blotting 分析显示,雷公藤红素显著下调 STAT3、SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达,进一步表明其可能通过抑制 STAT3,调控 SLC7A11 和 GPX4,从而诱导铁死亡。

STAT3 作为一个氧化应激相关的转录因子,在铁死亡中发挥重要作用^[30]。研究发现,STAT3 可通过多种途径调节肿瘤细胞的铁死亡。IL-6 通过 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /STAT3 通路诱导的铁死亡抵抗,在头颈癌的致癌作用中发挥关键作用^[31];长链非编码 RNA ALMS1-IT1 通过激活 STAT3 调节结直肠癌的铁死亡和免疫逃逸^[32];硫化物合成酶-1 通过调节 STAT3 抑制胃癌细胞发生铁死亡,进而促进胃癌发展^[33];脂肪酸合成酶通过核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) /STAT3/GPX4 通路诱导的铁死亡抵抗促进弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的阿霉素耐药^[34]。此外,许多药物通过靶向 STAT3 调控铁死亡,硫链丝菌素通过 STAT3/GPX4 信号通路诱导胰腺癌细胞铁死亡^[35],补骨脂甲素通过 STAT3/p53/SLC7A11 通路诱导骨肉瘤细胞铁死亡^[36],葫芦素 B 通过靶向 STAT3 诱导非小细胞肺癌铁死亡^[37]。最近的一项研究表明,STAT3 作为铁死亡的关键负调控因子,通过直接调控 GPX4、铁蛋白重链多肽 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) 和 SLC7A11 来调节胃癌细胞的铁死亡^[38]。本研究通过分子对接分析发现,雷公藤红素与 STAT3 具有良好的结合能力,并通过体外实验验证,STAT3 充当雷公藤红素诱导

胃癌细胞铁死亡的关键负调控因子,雷公藤红素抑制 STAT3 通过与脂质过氧化、铁代谢相关的多种机制触发铁死亡。

综上,本研究通过网络药理学、分子对接及体外实验,揭示了雷公藤红素通过抑制 STAT3 调控 GPX4 和 SLC7A11,诱导铁死亡的分子机制,为雷公藤红素在胃癌治疗中的潜在应用提供了新的实验及理论支持。尽管铁死亡是肿瘤复杂病理机制中的一部分,未来研究仍需探索雷公藤红素是否通过其他机制影响胃癌。此外,除了 STAT3 通路外,雷公藤红素可能还通过调控其他铁死亡相关信号通路发挥作用,这些潜在机制值得进一步研究。最后,为了验证雷公藤红素的临床可行性,还需要通过体内实验评估其有效性和安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xia C F, Dong X S, Li H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] Loe A K H, Francis R, Seo J, *et al.* Uncovering the dosage-dependent roles of Arid1a in gastric tumorigenesis for combinatorial drug therapy [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20200219.
- [3] Jin X, Liu Z R, Yang D X, *et al.* Recent progress and future perspectives of immunotherapy in advanced gastric cancer [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 948647.
- [4] Luoqian J Y, Yang W Y, Ding X L, *et al.* Ferroptosis promotes T-cell activation-induced neurodegeneration in multiple sclerosis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(8): 913-924.
- [5] Dong Y, Chen H W, Gao J L, *et al.* Bioactive ingredients in Chinese herbal medicines that target non-coding RNAs: Promising new choices for disease treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 515.
- [6] Hansen J, Palmfeldt J, Vang S, *et al.* Quantitative proteomics reveals cellular targets of celastrol [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26634.
- [7] Xiang Y N, Guo Z M, Zhu P F, *et al.* Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 1958-1975.
- [8] Su Y, Zhao D L, Jin C, *et al.* Dihydroartemisinin induces ferroptosis in HCC by promoting the formation of PEBP1/15-LO [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3456725.
- [9] Zhang R N, Pan T, Xiang Y, *et al.* Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis [J]. *Bioact Mater*, 2021, 13: 23-36.
- [10] Ding L X, Dang S W, Sun M J, *et al.* Quercetin induces

- ferroptosis in gastric cancer cells by targeting SLC1A5 and regulating the p-Camk2/p-DRP1 and NRF2/GPX4 Axes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 213: 150-163.
- [11] Hu J, Zhang F, Qin X, *et al.* Oxymatrine inhibits liver cancer progression by regulating SIRT1/YY1/GPX4 axis-mediated ferroptosis [J]. *Chem Res Toxicol*, 2025, 38(1): 46-57.
- [12] Ng S W, Chan Y H, Chellappan D K, *et al.* Molecular modulators of celastrol as the keystones for its diverse pharmacological activities [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1785-1792.
- [13] Li H F, Deng C F, Zhu N, *et al.* An ultrasensitive GSH-specific fluorescent probe unveils celastrol-induced ccRCC ferroptosis [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 134: 106454.
- [14] He P, Zou M S, Zhang C J, *et al.* Celastrol-loaded hyaluronic acid/cancer cell membrane lipid nanoparticles for targeted hepatocellular carcinoma prevention [J]. *Cells*, 2024, 13(21): 1819.
- [15] Chen X, Zhao Y, Luo W, *et al.* Celastrol induces ROS-mediated apoptosis via directly targeting peroxiredoxin-2 in gastric cancer cells [J]. *Theranostics*, 2020, 10(22): 10290-10308.
- [16] Huang M Q, Chen L, Ma X Y, *et al.* Celastrol attenuates the invasion and migration and augments the anticancer effects of olaparib in prostate cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 352.
- [17] Zhu Y P, Meng Y Q, Zhang J Z, *et al.* Recent Trends in anti-tumor mechanisms and molecular targets of celastrol [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(14): 5510-5530.
- [18] 庄莉, 翟园园, 姚卫峰, 等. 基于网络药理学的二至丸对肾脏保护作用的机制研究 [J]. *药学报*, 2019, 54(5): 877-885.
- [19] Zheng J S, Conrad M. The metabolic underpinnings of ferroptosis [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 920-937.
- [20] 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.
- [21] Cao W, Chen H D, Yu Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J*, 2021, 134(7): 783-791.
- [22] Liu J, Wang S, Zhang Y, *et al.* Traditional Chinese medicine and cancer: History, present situation, and development [J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(5): 561-569.
- [23] 徐资怡, 石金凤, 鲜静, 等. 雷公藤红素单用和联用抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4372-4385.
- [24] Yu Y, Yan Y, Niu F L, *et al.* Ferroptosis: A cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 193.
- [25] Wang H, Liu X C, Yan X Y, *et al.* An ATPase-Mimicking MXene nanozyme pharmacologically breaks the ironclad defense system for ferroptosis cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2024, 307: 122523.
- [26] Bian J H, Ding Y, Wang S, *et al.* Celastrol confers ferroptosis resistance via AKT/GSK3 β signaling in high-fat diet-induced cardiac injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 200: 36-46.
- [27] Zhang X, Qi M M, Huo K L, *et al.* Celastrol induces ferroptosis by suppressing RRM2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Heliyon*, 2024, 10(13): e33936.
- [28] Cai B L, Qi M M, Zhang X, *et al.* Integrating network pharmacology with *in vitro* experiments to validate the efficacy of celastrol against hepatocellular carcinoma through ferroptosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 3121-3141.
- [29] 李泽彦, 李国东, 孙硕, 等. 雷公藤红素诱导人胰腺癌 PANC-1 细胞铁死亡的机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2024, 40(6): 1062-1069.
- [30] Linher-Melville K, Singh G. The complex roles of STAT3 and STAT5 in maintaining redox balance: Lessons from STAT-mediated xCT expression in cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 451: 40-52.
- [31] Li M Y, Jin S F, Zhang Z Y, *et al.* Interleukin-6 facilitates tumor progression by inducing ferroptosis resistance in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2022, 527: 28-40.
- [32] Wu Z Y, Zou J W, Xie H, *et al.* LncRNA ALMS1-IT1 modulates ferroptosis and immune evasion in colorectal cancer through activating STAT3 [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(18): e70103.
- [33] Jiang Y, Li L Q, Li W B, *et al.* NFS1 inhibits ferroptosis in gastric cancer by regulating the STAT3 pathway [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2024, 56(5): 573-587.
- [34] Zhong X, Zhang W W, Zhang W M, *et al.* FASN contributes to ADM resistance of diffuse large B-cell lymphoma by inhibiting ferroptosis via NF- κ B/STAT3/GPX4 axis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2024, 25(1): 2403197.
- [35] Zhang W F, Gong M Y, Zhang W N, *et al.* Thiostrepton induces ferroptosis in pancreatic cancer cells through STAT3/GPX4 signalling [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 630.
- [36] Luo Y, Gao X, Zou L T, *et al.* Bavachin induces ferroptosis through the STAT3/P53/SLC7A11 axis in osteosarcoma cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1783485.
- [37] Zeng Z Y, Hu Y Y, Xiang J, *et al.* Cucurbitacin B targets STAT3 to induce ferroptosis in non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 978: 176805.
- [38] Ouyang S M, Li H X, Lou L L, *et al.* Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102317.