

穿心莲内酯调控铁自噬抗头颈鳞癌的作用机制

成果¹, 朱欣², 张陈平^{1,2,3*}

1. 温州医科大学研究生培养基地(浙江省肿瘤医院), 浙江 杭州 310022
2. 浙江省肿瘤医院, 浙江省头颈肿瘤转化医学研究重点实验室, 浙江 杭州 310022
3. 上海交通大学口腔医学院, 上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔颌面-头颈肿瘤科, 上海 200011

摘要: **目的** 探讨穿心莲内酯对头颈鳞癌的作用, 并通过脂质组学从铁自噬角度揭示其潜在的抗肿瘤作用机制。 **方法** 体外培养人头颈鳞癌 CAL27 细胞, 通过 CCK-8 实验、克隆形成实验考察穿心莲内酯对细胞增殖的抑制作用, 流式细胞术检测细胞凋亡。构建人头颈鳞癌患者来源异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 小鼠模型, 设置对照组和穿心莲内酯 (10 mg/kg) 组, 给药干预后, 动态观察肿瘤生长情况, 检测肿瘤组织中增殖相关指标 Ki67 的表达。采用脂质组学技术分析穿心莲内酯处理后 CAL27 细胞的代谢谱变化, 并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; 通过 Western blotting 检测细胞中铁自噬相关蛋白的表达。 **结果** 体外实验结果显示, 穿心莲内酯可显著抑制 CAL27 细胞增殖并诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$ 、 0.001), 且呈剂量相关性; 体内 PDX 模型实验结果显示, 穿心莲内酯能显著抑制肿瘤体内生长 ($P < 0.001$), 且肿瘤组织中 Ki67 阳性表达较对照组显著降低 ($P < 0.001$); 脂质组学分析及 KEGG 通路富集结果显示, 穿心莲内酯处理后细胞的差异代谢通路富集在铁死亡、自噬相关通路; Western blotting 结果证实, 穿心莲内酯可显著调控铁自噬相关蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明其能有效诱导 CAL27 细胞发生铁自噬。通过核受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 靶向降解剂及铁死亡抑制剂干预验证, 二者可显著逆转穿心莲内酯的作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 证实其抗肿瘤效应依赖铁自噬信号通路。 **结论** 穿心莲内酯可在体内外显著抑制头颈鳞癌增殖并诱导其凋亡, 其抗肿瘤作用机制与诱导肿瘤细胞发生铁自噬相关。

关键词: 穿心莲内酯; 头颈鳞癌; 铁自噬; 脂质组学; NCOA4

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2026)12 - 4684 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.12.014

Mechanism of andrographolide against head and neck squamous cell carcinoma by regulating ferroptophagy

CHENG Guo¹, ZHU Xin², ZHANG Chenping^{1,2,3}

1. Postgraduate training base Alliance of Wenzhou Medical University (Zhejiang Cancer Hospital), Hangzhou 310022, China
2. Provincial Key Laboratory of Precision Medicine Research on Head & Neck Cancer, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China
3. Department of Oral and Maxillofacial-Head and Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract: Objective To investigate the effect of andrographolide on head and neck squamous cell carcinoma, and reveal its potential anti-tumor mechanism from the perspective of ferroptophagy through lipidomics. **Methods** CAL27 cells were cultured *in vitro*. CCK-8 assay and colony formation assay were used to detect the inhibitory effect of andrographolide on cell proliferation, and flow cytometry was used to detect the cell apoptosis. A patient-derived xenograft (PDX) mouse model of human head and neck squamous cell carcinoma was established. Control group and andrographolide (10 mg/kg) group were set up, and after intervention with administration, the tumor growth was observed dynamically, and the expression of proliferation-related index Ki67 in tumor tissues was detected. Lipidomics technology was used to analyze the metabolic profile changes of CAL27 cells after andrographolide

收稿日期: 2026-02-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82072950); 浙江省自然科学基金资助项目 (ZCLMS25H1602)

作者简介: 成果, 硕士研究生, 研究方向为头颈鳞癌的临床与基础研究。E-mail: chengguo0119@163.com

*通信作者: 张陈平, 教授, 博士生导师, 从事头颈鳞癌的临床与基础研究。E-mail: zhangcp@zjcc.org.cn

treatment, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed. Western blotting was used to detect the expressions of ferroptophagy-related proteins in cells. **Results** The *in vitro* experimental results showed that andrographolide could significantly inhibit the proliferation of CAL27 cells and induce cell apoptosis ($P < 0.01, 0.001$), and showed a dose-dependent effect. The results of *in vivo* PDX model experiment showed that andrographolide could significantly inhibit the growth of tumors *in vivo* ($P < 0.001$), and the positive expression of Ki67 in tumor tissues was significantly reduced compared to the control group ($P < 0.001$). The lipidomics analysis and KEGG pathway enrichment results showed that the differential metabolic pathways of cells treated with andrographolide were enriched in ferroptosis and autophagy-related pathways. Western blotting results confirmed that andrographolide could significantly regulate the expressions of ferroptophagy-related proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), indicating that andrographolide could effectively induce ferroptophagy in CAL27 cells. Further validation with the nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) targeted degrader and ferroptosis inhibitor demonstrated that both agents markedly reversed the effects of andrographolide ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), verifying that its antitumor effect depends on the ferroptophagy signaling pathway. **Conclusion** Andrographolide could significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. Its anti-tumor mechanism is related to inducing ferroptophagy in tumor cells.

Key words: andrographolide; head and neck squamous cell carcinoma; ferroptophagy; lipidomics; NCOA4

头颈鳞癌是一种侵袭性的恶性肿瘤，通常在晚期诊断，具有快速复发和转移的倾向，往往导致患者预后不良^[1]。尽管其治疗方式取得了一定进展，包括精确放疗、精细手术技术和新型化疗药物，头颈鳞癌的死亡率仍高达 40%~50%^[2-3]。面对这些临床上的挑战，迫切需要阐明头颈鳞癌的潜在分子机制并制定创新的治疗策略。细胞死亡调控是肿瘤治疗的核心研究方向之一^[4]。铁自噬作为铁死亡与自噬交叉的新型细胞生理调控方式，区别于传统的细胞凋亡、坏死及焦亡，其核心是通过自噬相关通路特异性降解铁代谢相关蛋白，调控细胞内铁离子稳态与脂质过氧化水平，进而介导细胞程序性死亡^[5-6]。已有研究证实，铁自噬异常激活与肿瘤的发生、发展密切相关，肿瘤细胞中铁自噬通路的沉默会导致铁离子代谢紊乱、抗氧化能力增强，进而促进肿瘤增殖与治疗抵抗^[7]；而靶向诱导肿瘤细胞铁自噬发生，可有效抑制多种肿瘤的体内外生长，提示铁自噬是肿瘤治疗的潜在有效靶点^[8]。

来源于中药的活性成分因其良好的生物相容性、高效性和较少的不良反应而受到越来越多的关注^[9-10]。这些生物活性化合物在多种癌症类型中显示出抗肿瘤潜力^[11-15]。穿心莲内酯是一种从穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees 中分离的天然二萜内酯，在体内外均具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤活性^[16-17]。然而，穿心莲内酯在头颈鳞癌中的抗肿瘤作用及机制目前尚不清楚。本研究首先通过体内外实验验证穿心莲内酯抗头颈鳞癌的活性，再借助脂质组学技术联合京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes,

KEGG) 通路富集分析筛选其作用的关键代谢通路，进而聚焦铁自噬通路，验证穿心莲内酯对铁自噬相关蛋白的调控作用，旨在从铁自噬角度揭示穿心莲内酯抗头颈鳞癌的潜在分子机制，同时也为中药靶向铁自噬治疗肿瘤提供新的研究思路与方向。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 BALB/c-nu/nu 裸鼠，4~6 周龄，体重 20~22 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，动物生产许可证号 SCXK (沪) 2022-0004。裸鼠饲养于浙江省肿瘤医院实验动物中心 SPF 级饲养室，饲养环境温度 22~25 °C，相对湿度 50%~60%，明暗周期 12 h/12 h，自由摄食饮水，适应性饲养 1 周后进行实验。动物实验经浙江省肿瘤医院实验动物伦理委员会批准 (批准号 zjzlsd-2025-02-009)。

1.2 细胞

人头颈鳞癌 CAL27 细胞 (货号 CL-0265, 批号 20241228) 购自武汉普诺赛生物技术有限公司。

1.3 药品与试剂

穿心莲内酯 (质量分数为 99.97%, 批号 146450) 购自上海陶术生物科技股份有限公司; CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (批号 25002K1018) 购自美国 APEX BIO 公司; 4% 多聚甲醛固定液 (批号 A154250103)、结晶紫染色液 (批号 091423231215)、细胞凋亡检测试剂盒 (批号 Z945250527) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; β -actin 抗体 (批号 H681707031)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号 H661365003)、核

受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 抗体 (批号 H651616010) 购自杭州华安生物技术有限公司; 溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体 (批号 102045400) 购自上海艾比玛特医药科技有限公司; p62 抗体 (批号 12D5S)、微管相关蛋白轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B) 抗体 (批号 D119T)、Ki67 抗体 (批号 10D9T) 购自美国 CST 公司; NCOA4 靶向降解剂 PROTAC NCOA4 degrader-1 (质量分数为 98.73%, 批号 705844)、铁死亡抑制剂 Fer-1 (质量分数为 99.71%, 批号 374576) 购自美国 MedChemExpress 公司。

1.4 仪器

3111 型 CO₂ 细胞孵育箱、Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); IX73 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); ImageQuant 800 型化学发光凝胶成像系统 (英国 Amersham 公司); JY600C 型 Western blot 电泳仪、JY-ZY5 型 Western blot 电转仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 细胞培养 CAL27 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 细胞生长密度达到 70%~80% 时, 进行传代处理, 取对数生长期的 CAL27 细胞用于后续实验。

2.1.2 CCK-8 实验检测细胞活力 取对数生长期的 CAL27 细胞以 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 细胞贴壁后分别加入不同浓度 (0、10、20、30、40、50、60、70、80、100 μ mol/L) 的穿心莲内酯处理 48 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.1.3 克隆形成实验检测细胞增殖 取对数生长期的 CAL27 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后更换为不同浓度 (0、20、40、80 μ mol/L) 的穿心莲内酯继续培养。48 h 后更换为新鲜培养基, 连续培养 14 d, 期间每 2 天更换新鲜培养基 1 次。细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染液染色 15 min, 晾干后拍照并进行统计分析。

2.1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的 CAL27 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 细

胞贴壁后更换为不同浓度 (0、20、40、80 μ mol/L) 的穿心莲内酯处理 48 h, 按照试剂盒说明书测定细胞凋亡情况。

2.1.5 脂质组学分析 脂质组学检测委托苏州帕诺米克生物医药科技有限公司完成。

(1) 样本收集: 设置对照组和给药组, 每组设置 5 个复孔。对照组给予完全培养基培养, 给药组用 40 μ mol/L 穿心莲内酯处理 48 h; 弃去培养基后, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 加入细胞裂解液刮取细胞, 收集至 1.5 mL 离心管并于 -80 °C 冻存备用。

(2) 样本前处理: 冻存样本中加入甲醇-氯仿混合液 (2:1), 涡旋振荡 30 s 后 4 °C 静置 10 min; 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取下层有机相, 加入等体积预冷的正己烷, 涡旋离心后取上清; 上清液经氮吹仪干燥后, 用异丙醇-甲醇-水混合液 (2:1:1) 复溶, 经 0.22 μ m 有机滤膜滤过后, 采用超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪 (UHPLC-Q Exactive HF-X) 检测。

(3) 色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m); 采用正、负离子双模式检测, 正离子模式下的流动相为含 0.1% 甲酸的水溶液 (A1)-乙腈 (B1), 梯度洗脱: 0~2.0 min, 30% B1; 2.0~10.0 min, 30%~95% B1; 10.0~13.0 min, 95% B1; 13.0~13.1 min, 95%~30% B1; 13.1~16.0 min, 30% B1; 负离子模式下的流动相为含 5 mmol/L 乙酸铵的水溶液 (A2)-乙腈 (B2), 梯度洗脱程序同正离子模式。

(4) 质谱条件: 采用 Q Exactive HF-X 高分辨质谱仪, 电喷雾电离源, 正、负离子模式下进行全扫描检测; 质谱扫描范围 m/z 100~1 500, 一级分辨率 70 000, 二级分辨率 17 500; 正离子模式: 喷雾电压 3.2 kV, 毛细管温度 350 °C, S-Lens RF 30%, 鞘气流量 40 arb, 辅助气流量 10 arb; 负离子模式: 喷雾电压 2.8 kV, 毛细管温度 350 °C, S-Lens RF 60%, 鞘气流量 40 arb, 辅助气流量 10 arb; 碰撞能量设置为 20、40、60 eV, 用于脂质二级碎片离子检测。

2.1.6 Western blotting 检测 NCOA4、p62 和 LC3B 蛋白表达 取对数生长期的 CAL27 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后更换为不同浓度 (0、20、40、80 μ mol/L) 的穿心莲内酯处理 48 h。收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液在冰上裂解 30 min, 使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白

质浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至PVDF膜,用5%脱脂牛奶封闭后,加入一抗,4℃孵育过夜;加入二抗,室温孵育1h;加入ECL化学发光试剂显影,使用蛋白印迹成像系统拍照。

2.1.7 铁死亡抑制剂与穿心莲内酯联合处理对CAL27细胞存活及凋亡的影响 设置对照组、Fer-1(0.5 μmol/L)组、穿心莲内酯(40 μmol/L)组和穿心莲内酯+Fer-1组,加入相应药物处理48h,对照组加入不含药物的培养基。按“2.1.2”项下方法检测细胞存活率,按“2.1.4”项下方法检测细胞凋亡率。

2.1.8 NCOA4降解剂与穿心莲内酯联合处理对CAL27细胞NCOA4、SLC7A11和GPX4蛋白表达的影响 设置对照组、NCOA4降解剂(2 nmol/L)组、穿心莲内酯(40 μmol/L)组和穿心莲内酯+NCOA4降解剂组,加入相应药物处理48h,对照组加入不含药物的培养基。按“2.1.6”项下方法检测相关蛋白表达。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药 本研究按照赫尔辛基宣言(2013年修订)进行,肿瘤样本取自1名接受舌癌手术切除的患者,获得患者的知情同意,并经浙江省肿瘤医院伦理委员会批准(批准号IRB-2020-1)。将肿瘤组织剪切成约10 mm³的组织小块,用套管针接种于裸鼠侧腹部。接种后每周观察裸鼠一般状况及成瘤情况,待肿瘤体积生长至100~150 mm³时,记为P1代。将初代成瘤组织剥离后按上述方法继续传代至P3代,视为患者来源异种移植(patient-derived xenograft, PDX)模型构建成功。采用P3代头颈鳞癌PDX模型裸鼠进行后续实验,保证肿瘤组织的生物学特性稳定。

P3代头颈鳞癌PDX模型裸鼠随机分为对照组和穿心莲内酯(10 mg/kg)组,每组4只。裸鼠分别ip生理盐水或穿心莲内酯,每3天1次,连续给药15 d。给药期间,每隔3 d称量裸鼠体质量,并用游标卡尺测量肿瘤长径和宽径,并计算肿瘤体积[肿瘤体积=1/2(长径×宽径²)]。给药结束后,使用异氟烷对裸鼠实施安乐死,解剖取肿瘤组织,称定质量并拍照。

2.2.2 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肿瘤组织病理变化 肿瘤组织经固定、脱水、包埋、切片后进行脱蜡复水,用苏木素染液染色细

胞核,伊红染液染色胞质,脱水透明并用中性树脂封片,室温晾干后在显微镜下观察并拍照。

2.2.3 免疫组化检测肿瘤组织Ki67表达 取肿瘤组织切片进行脱蜡复水、抗原修复,用过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶;5%牛血清白蛋白封闭后,孵育一抗和二抗,用DAB染色并复染封片,于显微镜下观察并拍照。

2.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism(9.5版)软件进行统计分析,两组比较采用*t*-test,多组比较采用单因素方差分析。

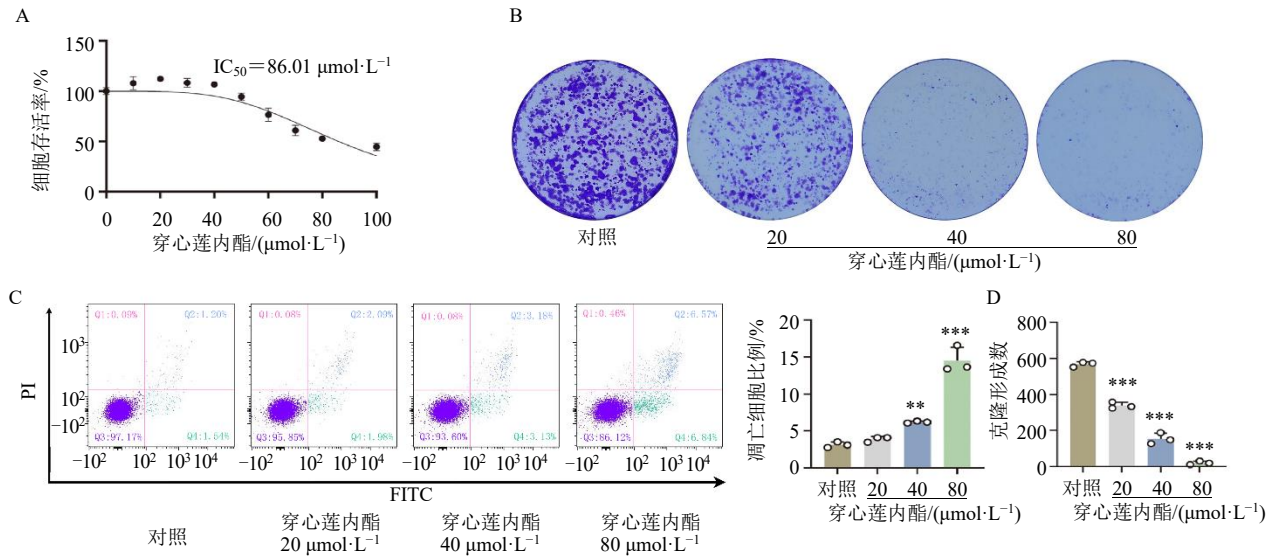
3 结果

3.1 穿心莲内酯抑制CAL27细胞增殖并诱导其凋亡

如图1-A所示,不同浓度的穿心莲内酯处理CAL27细胞48h后,细胞存活率呈剂量相关性降低,半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)为86.01 μmol/L,表明穿心莲内酯对CAL27细胞具有显著的增殖抑制作用,采用20、40、80 μmol/L穿心莲内酯进行后续研究。克隆形成实验结果(图1-B、D)显示,与对照组比较,穿心莲内酯各给药组细胞克隆形成数显著减少($P < 0.001$),且克隆体积明显缩小,进一步证实穿心莲内酯能有效抑制CAL27细胞的克隆形成能力,降低其体外成瘤能力。采用流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果见图1-C,对照组细胞自然凋亡率较低,穿心莲内酯(40、80 μmol/L)组细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$ 、 0.001),表明穿心莲内酯显著诱导CAL27细胞发生凋亡。以上结果表明穿心莲内酯能有效抑制CAL27细胞增殖并诱导其凋亡,且呈剂量相关性。

3.2 穿心莲内酯抑制小鼠体内头颈鳞癌肿瘤生长

如图2-A所示,患者来源原代头颈鳞癌肿瘤组织和PDX模型各代肿瘤组织病理结构高度相似,表明本研究成功构建了头颈鳞癌PDX模型,且该模型很好地保留了原代肿瘤的组织学特征。体内PDX模型实验结果(图2-B)显示,与对照组比较,穿心莲内酯组肿瘤增殖被显著抑制。肿瘤生长曲线结果(图2-C)表明,与对照组比较,穿心莲内酯组小鼠肿瘤体积增长速率显著减慢($P < 0.001$)。连续治疗15 d后处死小鼠并剥离肿瘤组织,穿心莲内酯组肿瘤质量较对照组显著降低($P < 0.01$,图2-D),且肿瘤质量与体质量的比值较对照组显著降低($P < 0.01$,图2-G),表明穿心莲内酯在体内可显著抑制头颈鳞癌PDX模型肿瘤的生长。给药期间2组

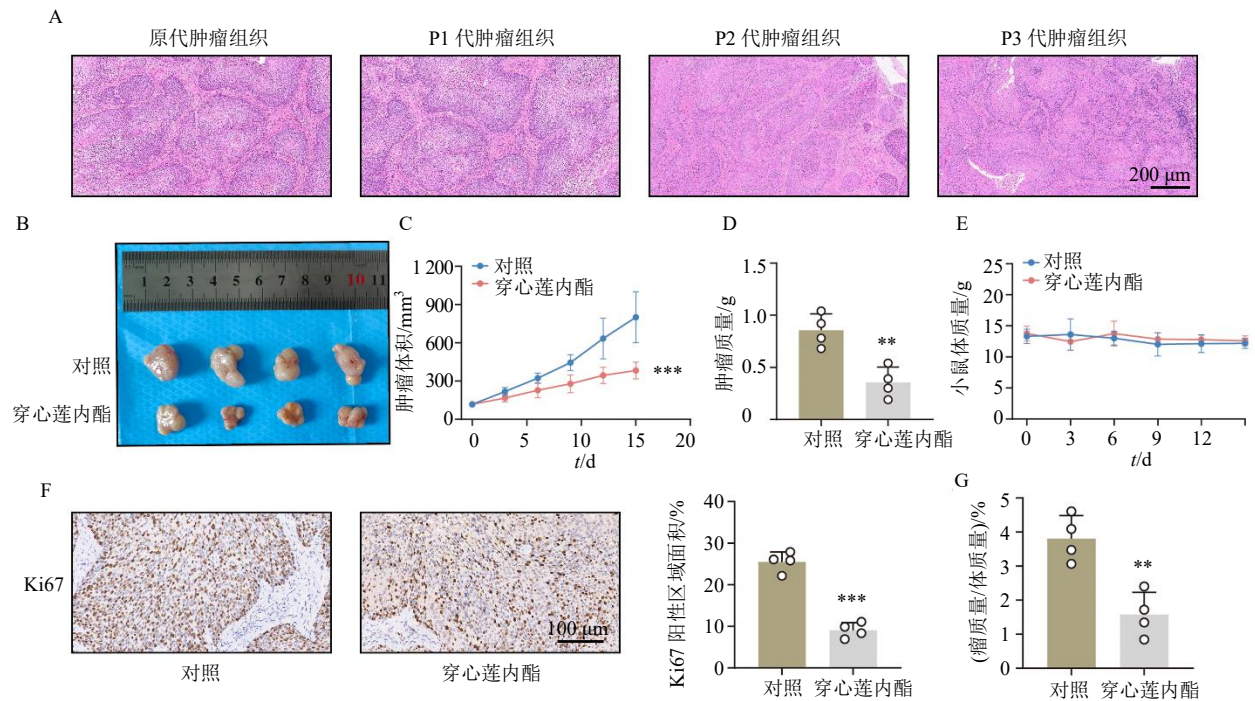


A-穿心莲内酯对 CAL27 细胞存活率的影响 ($n=6$); B、D-穿心莲内酯对 CAL27 细胞克隆形成的影响 ($n=3$); C-穿心莲内酯对 CAL27 细胞凋亡的影响 ($n=3$); 与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$, 下同。

A-effect of andrographolide on survival rate of CAL27 cells ($n=6$); B, D-effect of andrographolide on colony formation of CAL27 cells ($n=3$); C-effect of andrographolide on apoptosis of CAL27 cells ($n=3$); * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group, same as below figures.

图 1 穿心莲内酯抑制 CAL27 细胞增殖并诱导其凋亡 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Andrographolide inhibits proliferation and induces apoptosis of CAL27 cells ($\bar{x} \pm s$)



A-原代肿瘤组织和 P1~P3 代肿瘤组织的 HE 染色图 ($\times 100$); B-PDX 模型小鼠肿瘤组织代表图; C-小鼠肿瘤体积生长曲线; D-小鼠肿瘤组织质量统计; E-小鼠体质量变化曲线; F-免疫组化检测肿瘤组织中 Ki67 蛋白表达 ($\times 200$); G-肿瘤质量与小鼠体质量的比值。

A-HE staining images of primary tumor tissue and P1—P3 generation tumor tissues ($\times 100$); B-representative images of tumor tissues from PDX model mice; C-growth curve of tumor volume in mice; D-quantitative analysis of tumor tissue weight in mice; E-body weight change curve of mice; F-expression of Ki67 protein in tumor tissues detected by immunohistochemistry ($\times 200$); G-ratio of tumor weight to mouse body weight.

图 2 穿心莲内酯在头颈鳞癌 PDX 模型中抑制肿瘤生长 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

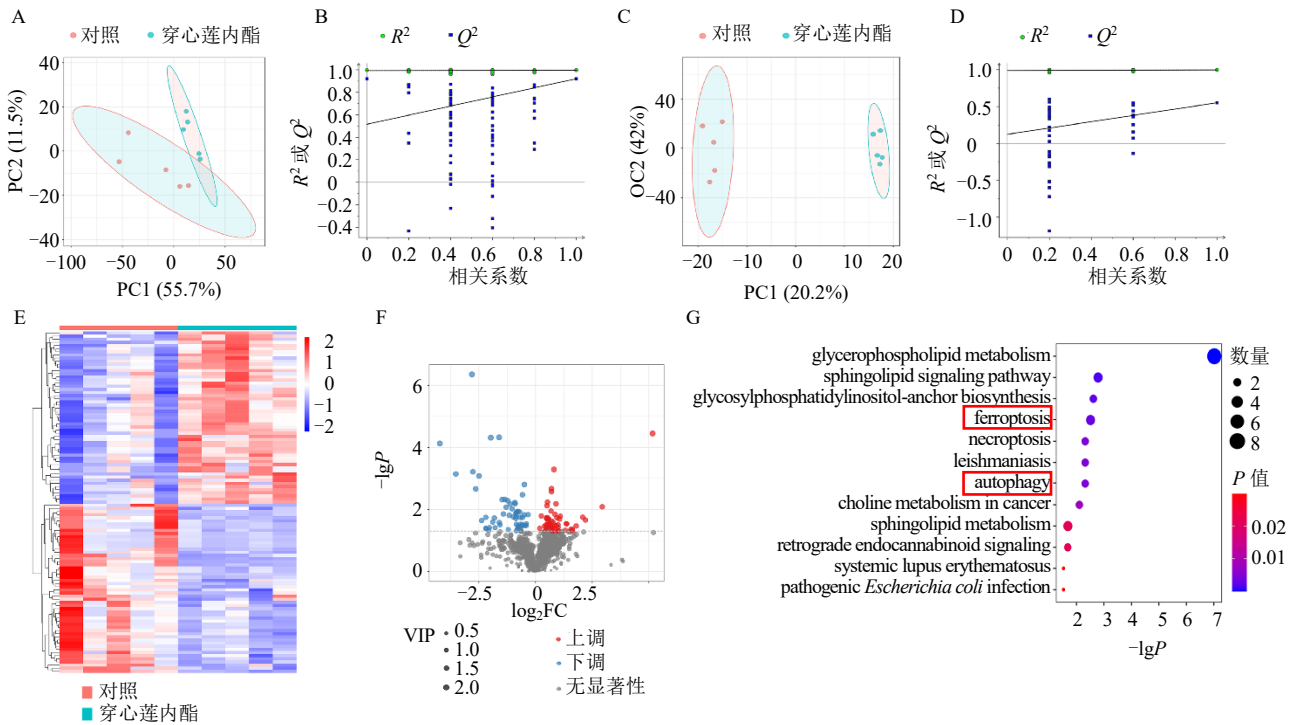
Fig. 2 Andrographolide inhibits tumor growth in PDX model of head and neck squamous cell carcinoma ($\bar{x} \pm s, n=4$)

小鼠均无明显精神萎靡、摄食减少等异常状况，体质量无显著差异（图 2-E），表明穿心莲内酯在实验剂量下对小鼠无明显毒性作用。免疫组化检测肿瘤组织 Ki67 蛋白表达，结果见图 2-F，Ki67 阳性信号定位于肿瘤细胞核，穿心莲内酯组肿瘤组织中 Ki67 蛋白阳性表达较对照组显著下调 ($P < 0.001$)，提示穿心莲内酯可通过抑制肿瘤细胞增殖活性发挥抗头颈鳞癌的作用。

3.3 脂质组学分析结果

如图 3-A~D 所示，对照组和给药组共筛选出

120 种差异表达的脂质分子 ($P < 0.05$)。利用热图（图 3-E）和火山图（图 3-F）对差异脂质分子进行可视化分析。同时，通过 KEGG 富集分析生成气泡图（图 3-G）。在富集结果中，铁死亡通路和自噬通路为本研究关注的重点。脂质组学分析显示，穿心莲内酯可显著上调磷脂酰乙醇胺的表达水平。磷脂酰乙醇胺作为脂质过氧化的核心底物，其水平升高可驱动铁死亡的发生。上述结果提示，穿心莲内酯可能通过调控铁死亡、自噬相关通路分子发挥抗头颈鳞癌作用。



A-PLS-DA 得分图；B-PLS-DA 置换检验；C-OPLS-DA 评分图；D-OPLS-DA 置换检验；E-差异脂质热图；F-差异脂质火山图；G-KEGG 通路富集气泡图。

A-score plot of PLS-DA; B-permutation test of PLS-DA; C-score plot of OPLS-DA; D-permutation test of OPLS-DA; E-heatmap of differential lipid metabolites; F-volcano plot of differential lipid metabolites; G-bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis.

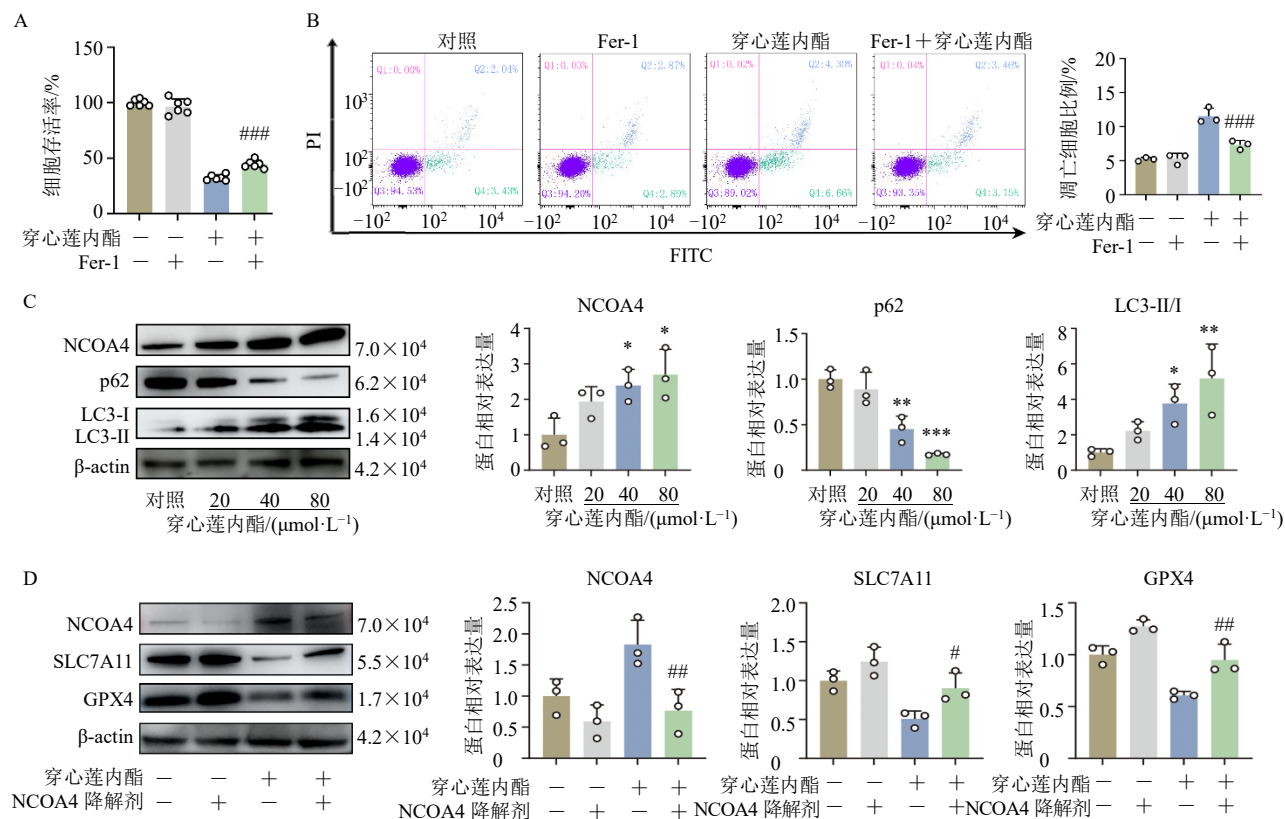
图 3 脂质组学分析结果 ($n = 5$)

Fig. 3 Result of lipidomics analysis ($n = 5$)

3.4 穿心莲内酯诱导 CAL27 细胞发生铁自噬

为明确铁死亡在穿心莲内酯抗头颈鳞癌过程中的作用，采用铁死亡特异性抑制剂 Fer-1 与穿心莲内酯联合处理 CAL27 细胞，如图 4-A、B 所示，与穿心莲内酯组比较，穿心莲内酯与 Fer-1 联合处理后细胞存活率显著升高 ($P < 0.001$)，细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$)。提示 Fer-1 可显著逆转穿心莲内酯的抑增殖、促凋亡效应，证实穿心莲内酯发挥抗头颈鳞癌作用依赖铁死亡通路。

结合脂质组学 KEGG 富集分析结果，推测穿心莲内酯抗头颈鳞癌可能与自噬依赖性铁死亡（即铁自噬）相关。铁自噬是一种选择性自噬过程，通过 NCOA4 介导铁蛋白降解，进而调控细胞内铁稳态^[7]。铁蛋白是胞质内主要的铁储存蛋白，由 2 个亚基铁蛋白重链 1（ferritin heavy chain 1, FTH1）和铁蛋白轻链（ferritin light chain, FTL）组成^[5]。NCOA4 作为铁蛋白降解的特异性货物受体，其介导的铁蛋白降解过程即为铁自噬，对维持铁稳态具有重要意



A-穿心莲内酯和 Fer-1 联合处理对 CAL27 细胞存活率的影响 (n=6); B-穿心莲内酯和 Fer-1 联合处理对 CAL27 细胞凋亡的影响 (n=3); C-穿心莲内酯对 CAL27 细胞铁自噬相关蛋白表达的影响 (n=3); D-穿心莲内酯和 NCOA4 降解剂联合处理对 CAL27 细胞铁自噬相关蛋白表达的影响 (n=3); 与穿心莲内酯组比较: *P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001。

A-effect of combined treatment of andrographolide and Fer-1 on survival rate of CAL27 cells (n=6); B-effect of combined treatment of andrographolide and Fer-1 on apoptosis of CAL27 cells (n=3); C-effect of andrographolide on expressions of ferroptophagy-related related proteins in CAL27 cells (n=3); D-effect of combined treatment of andrographolide and NCOA4 degrader on expressions of ferroptophagy-related related proteins in CAL27 cells (n=3); *P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001 vs andrographolide group.

图 4 穿心莲内酯诱导铁死亡并调控铁自噬相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Andrographolide induces ferroptosis and regulates expressions of ferroptophagy-related proteins ($\bar{x} \pm s$)

义^[6]。作为铁自噬的关键调控因子，NCOA4 的表达水平显著影响铁自噬的活性。为探究穿心莲内酯对 CAL27 细胞铁自噬的调控作用，采用 Western blotting 检测不同浓度穿心莲内酯处理后的 CAL27 细胞中铁自噬相关蛋白的表达水平，结果见图 4-C，与对照组比较，40、80 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯处理后的细胞中铁自噬关键蛋白 NCOA4 和 LC3-II/I 表达显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)，p62 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)，且呈剂量相关性，表明穿心莲内酯可显著激活 CAL27 细胞的铁自噬通路。

为了进一步明确 NCOA4 在穿心莲内酯诱导的铁自噬中的作用，使用 NCOA4 靶向降解剂 (PROTAC NCOA4 degrader-1) 选择性地抑制 NCOA4 的表达。PROTAC NCOA4 degrader-1 是一种基于 von Hippel-Lindau 肿瘤抑制因子 (von

Hippel-Lindau tumor suppressor, VHL) 的 NCOA4 蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTAC)，可特异性靶向降解 NCOA4 蛋白^[18]。如图 4-D 所示，与穿心莲内酯组比较，穿心莲内酯与 NCOA4 降解剂联合处理后细胞中 NCOA4 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)，GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。以上结果表明穿心莲内酯可以有效诱导 CAL27 细胞发生铁自噬，提示铁自噬通路的激活可能是穿心莲内酯发挥抗头颈鳞癌作用的重要分子机制。

4 讨论

头颈鳞癌的临床治疗目前面临放疗抵抗、复发转移率高、预后不佳等瓶颈问题^[2-3]，因此挖掘低毒、高效的抗肿瘤活性物质，优化现有治疗策略，成为头颈鳞癌临床研究的重要方向。中药因其多靶

点、不良反应少的独特优势,为抗肿瘤药物的研发提供了丰富的资源,其中从中药中筛选高活性、低毒性的抗肿瘤单体,是当前中药抗肿瘤研究的热点领域。穿心莲内酯作为穿心莲的核心活性成分,已被证实对多种恶性肿瘤具有抗肿瘤作用,且在多项动物实验和临床试验中均表现出良好的低毒性特征,使其成为极具临床转化潜力的安全天然抗肿瘤药物^[16-17,19-20]。既往研究表明,穿心莲内酯可调控细胞周期进程、诱导肿瘤细胞凋亡等途径,抑制肺癌、结直肠癌、神经胶质瘤和胰腺癌等肿瘤进展^[19,21-26],但其对头颈鳞癌细胞的增殖抑制效应及具体作用机制尚未得到系统的实验验证。本研究采用脂质组学技术结合 KEGG 富集分析,将穿心莲内酯的抗头颈鳞癌作用与铁死亡、自噬通路相关联,突破了既往抗肿瘤机制研究局限于传统经典通路的现状。进一步的实验证实了铁自噬是穿心莲内酯发挥抗头颈鳞癌作用的关键机制,即通过调控铁自噬相关蛋白表达激活铁自噬通路,且抑制铁自噬关键调控因子 NCOA4 可逆转该效应。

本研究采用 PDX 模型验证了穿心莲内酯体内抗头颈鳞癌的有效性及其良好生物安全性,解决了既往相关研究缺乏临床相关性模型验证的问题,提升了研究结果的临床参考意义^[27];而脂质组学与分子生物学技术的结合,清晰揭示了穿心莲内酯通过诱导铁自噬发挥抗肿瘤作用的核心逻辑,与当前铁自噬作为肿瘤治疗新兴潜在靶点的研究热点相契合^[28],体现了中药单体抗肿瘤的独特优势。此外,脂质组学筛选发现,穿心莲内酯处理后 PE[18:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)]、PE[18:0/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)]、PE(18:0/0:0)3种磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)亚型水平显著升高。PE作为细胞膜及细胞器膜的重要组成成分,其含量升高可破坏细胞膜稳定性,同时PE是脂质过氧化的重要底物,而脂质过氧化是铁死亡的核心特征。结合本研究证实的铁自噬激活效应,推测上述差异PE亚型的升高可能与铁自噬介导的铁离子蓄积相关,铁自噬激活后,NCOA4介导铁蛋白降解释放出游离铁离子,过量游离铁引发芬顿反应,加速PE等脂质的过氧化进程,促进铁死亡。

本研究虽明确了穿心莲内酯通过激活 NCOA4 介导的铁自噬发挥抗头颈鳞癌效应,但仍存在不足。①本研究仅验证了穿心莲内酯诱导铁自噬的现象,尚未深入阐明其调控铁自噬的上游分子靶点及

上下游信号轴,对铁自噬与铁死亡、凋亡等程序性死亡方式的交叉调控机制仍有待进一步解析。②本研究仅选用 CAL27 单一细胞系开展体外实验,细胞模型代表性不足,后续研究将系统补充 SCC25、FaDu 等其他头颈鳞癌细胞系的重复实验,进一步验证穿心莲内酯抗头颈鳞癌结论的普适性。③未开展穿心莲内酯与临床放化疗药物的联用探究,其在联合治疗中的应用价值尚不明确。结合已有文献分析,E3泛素蛋白连接酶2(HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2, HERC2)^[29]、干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)^[30]、共济失调毛细血管扩张突变蛋白(ataxia telangiectasia mutated, ATM)^[31]、叉头框蛋白O1(forkhead box O1, FOXO1)^[32]等分子均被证实可通过调控 NCOA4 表达、稳定性或磷酸化修饰参与铁自噬进程,NCOA4-FTH1 轴更是介导铁自噬驱动铁死亡的关键环节^[33]。因此,后续可围绕上述通路深入挖掘穿心莲内酯调控铁自噬的分子机制,并补充铁死亡抑制剂干预、NCOA4 沉默及过表达等功能回复实验,直接证实铁自噬在其抗肿瘤效应中的必要性。

综上,本研究明确了铁自噬是穿心莲内酯抗头颈鳞癌的关键机制,为穿心莲内酯作为头颈鳞癌潜在候选中药单体提供了新的实验依据,也为中药靶向铁自噬抗肿瘤研究提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xue Y T, Jiang X J, Wang J R, *et al.* Effect of regulatory cell death on the occurrence and development of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Biomark Res*, 2023, 11(1): 2.
- [2] Chow L Q M. Head and neck cancer [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1): 60-72.
- [3] Johnson D E, Burtneis B, Leemans C R, *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6: 92.
- [4] Peng F, Liao M R, Qin R, *et al.* Regulated cell death (RCD) in cancer: Key pathways and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 286.
- [5] Galy B, Conrad M, Muckenthaler M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(2): 133-155.
- [6] Mancias J D, Wang X X, Gygi S P, *et al.* Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy [J]. *Nature*, 2014, 509(7498):

- 105-109.
- [7] Chen X, Tsvetkov A S, Shen H M, *et al.* International consensus guidelines for the definition, detection, and interpretation of autophagy-dependent ferroptosis [J]. *Autophagy*, 2024, 20(6): 1213-1246.
- [8] Gao M H, Monian P, Pan Q H, *et al.* Ferroptosis is an autophagic cell death process [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1021-1032.
- [9] Na X, Li L, Liu D M, *et al.* Natural products targeting ferroptosis pathways in cancer therapy (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2024, 52(3): 123.
- [10] Shiao J P, Chuang Y T, Tang J Y, *et al.* The impact of oxidative stress and Akt pathway on cancer cell functions and its application to natural products [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1845.
- [11] Wang Y H, Cheng S H, Chen J Y, *et al.* Targeting ferroptosis regulators in lung cancer: Exploring natural products [J]. *Heliyon*, 2024, 10(14): e33934.
- [12] Yang Y J, Jiang B, Shi L J, *et al.* The potential of natural herbal plants in the treatment and prevention of non-small cell lung cancer: An encounter between ferroptosis and mitophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 346: 119555.
- [13] Luo Y, Zhu L, Ren Z Y, *et al.* *Curcumae Rhizoma*: An anti-cancer traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(4): 509-515.
- [14] Jian X, Shi C, Luo W C, *et al.* Therapeutic effects and molecular mechanisms of quercetin in gynecological disorders [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116418.
- [15] 安雪菁, 崔齐晓, 赵盈, 等. 蟾蜍它灵对人头颈部鳞状细胞癌的影响及作用机制 [J]. *中草药*, 2026, 57(4): 1325-1335.
- [16] Hu J X, Li Y, Xie X, *et al.* The therapeutic potential of andrographolide in cancer treatment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 180: 117438.
- [17] Zhang H, Li S F, Si Y S, *et al.* Andrographolide and its derivatives: Current achievements and future perspectives [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 224: 113710.
- [18] Ji J A, Jin Y H, Ma S N, *et al.* Discovery of a NCOA4 degrader for labile iron-dependent ferroptosis inhibition [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(15): 12521-12533.
- [19] Li J Q, Huang S Q, Wang Q, *et al.* Andrographolide promoted ferroptosis to repress the development of non-small cell lung cancer through activation of the mitochondrial dysfunction [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154601.
- [20] Paul S, Roy D, Pati S, *et al.* The adroitness of andrographolide as a natural weapon against colorectal cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 731492.
- [21] Liu Y F, Feng Z Q, Chu T H, *et al.* Andrographolide sensitizes KRAS-mutant colorectal cancer cells to cetuximab by inhibiting the EGFR/Akt and PDGFR β /Akt signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155462.
- [22] Li W X, Fu H J, Fang L Y, *et al.* Andrographolide induced ferroptosis in multiple myeloma cells by regulating the p38/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2023, 742: 109622.
- [23] Wang W T, Yan S Y, Ma M Q, *et al.* Andrographolide induces ferroptosis in colorectal cancer via P53-mediated downregulation of the SLC7A11/GPX4 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157470.
- [24] Zhang Z S, Gao Z X, He J J, *et al.* Andrographolide sensitizes glioma to temozolomide by inhibiting DKK1 expression [J]. *Br J Cancer*, 2024, 131(8): 1387-1398.
- [25] Midde A, Arri N, Kristian T, *et al.* Targeting mitochondrial ribosomal protein expression by andrographolide and melatonin for colon cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2025, 619: 217647.
- [26] Zhuang K R, Chen C F, Chan H Y, *et al.* Andrographolide suppresses the malignancy of pancreatic cancer via alleviating DNMT3B-dependent repression of tumor suppressor gene ZNF382 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155860.
- [27] Liu Y H, Wu W T, Cai C J, *et al.* Patient-derived xenograft models in cancer therapy: Technologies and applications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 160.
- [28] Wang J W, Wu N, Peng M J, *et al.* Ferritinophagy: Research advance and clinical significance in cancers [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9: 463.
- [29] Liu H B, Shen L Q, Gong X Y, *et al.* Mechanistic insights into the iron-sulfur cluster-dependent interaction of the autophagy receptor NCOA4 with the E3 ligase HERC2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(30): e2510269122.
- [30] Wu J, Liu Q J, Zhang X F, *et al.* The interaction between STING and NCOA4 exacerbates lethal sepsis by orchestrating ferroptosis and inflammatory responses in macrophages [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 653.
- [31] Wu H, Liu Q, Shan X Y, *et al.* ATM orchestrates ferritinophagy and ferroptosis by phosphorylating NCOA4 [J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 2062-2077.
- [32] Wang X, Xu L, Meng Y, *et al.* FOXO1-NCOA4 axis contributes to cisplatin-induced cochlea spiral ganglion neuron ferroptosis via ferritinophagy [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(40): 2402671.
- [33] Luo C Y, Liang H S, Ji M T, *et al.* Autophagy induced by mechanical stress sensitizes cells to ferroptosis by NCOA4-FTH1 axis [J]. *Autophagy*, 2025, 21(6): 1263-1282.