

## 基于过氧化物还原酶 1 介导的粉防己碱调控乳腺癌细胞铁死亡机制研究

辛国松<sup>1,2</sup>, 孙越<sup>1</sup>, 刘禹含<sup>1</sup>, 侯妍秀<sup>1</sup>, 李海茹<sup>3\*</sup>

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨医科大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150086

**摘要:** 目的 基于过氧化物还原酶 1 (peroxiredoxin 1, PRDX1) 研究粉防己碱调控磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /糖原合成激酶-3 $\beta$  (glycogen synthesizing kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 信号通路诱导乳腺癌细胞铁死亡的作用机制。方法 人乳腺癌 MCF-7 细胞转染 PRDX1 siRNA 后, 给予粉防己碱干预, 考察粉防己碱对 MCF-7 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响; 检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、Fe<sup>2+</sup>、细胞内及线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位和线粒体膜孔通透性; 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1)、p53、PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路及核转录因子 E2 相关因子 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) /血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路相关蛋白及基因的表达。结果 粉防己碱可呈剂量相关性抑制 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭并诱导细胞凋亡 ( $P < 0.01$ ), 升高细胞及线粒体内 ROS、MDA 和 Fe<sup>2+</sup> 水平 ( $P < 0.01$ ), 加剧脂质过氧化, 降低线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ ), 提高线粒体膜孔通透性 ( $P < 0.01$ ), 上调 HO-1、p53、GSK-3 $\beta$  和 VDAC1 的表达 ( $P < 0.01$ ), 下调 Nrf2、PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的表达 ( $P < 0.01$ )。敲低 PRDX1 基因可显著增强粉防己碱的上述作用 ( $P < 0.01$ )。结论 粉防己碱通过调控 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路诱导 MCF-7 细胞发生线粒体相关性铁死亡, 且 PRDX1 在其中发挥关键的调控作用。

**关键词:** 粉防己碱; PRDX1; 乳腺癌; 铁死亡; PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)13-5120-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.13.015

## Mechanism of tetrandrine regulating ferroptosis of breast cancer cells mediated by peroxiredoxin 1

XIN Guosong<sup>1,2</sup>, SUN Yue<sup>1</sup>, LIU Yuhan<sup>1</sup>, HOU Yanxiu<sup>1</sup>, LI Hairu<sup>3</sup>

1. Engineering Research Center for Pharmaceutical Technology, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. National Ministry of Education Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Harbin 150076, China

3. Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism by which tetrandrine regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) signaling pathway to induce ferroptosis in breast cancer cells based on peroxiredoxin 1 (PRDX1). **Methods** Human breast cancer MCF-7 cells transfected with PRDX1 siRNA were treated with tetrandrine to examine its effects on cell proliferation, apoptosis, migration and invasion. The levels of malondialdehyde (MDA), Fe<sup>2+</sup>, intracellular and mitochondrial reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential, and mitochondrial membrane permeability were measured. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expressions of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), p53, PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway and nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway related proteins and genes. **Results** Tetrandrine dose-dependently inhibited MCF-7 cell proliferation, migration and invasion while inducing apoptosis

收稿日期: 2026-01-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (PL2025H208); 2023 年度哈尔滨商业大学镜湖学者支持计划; 哈尔滨市科技计划自筹经费项目 (2023ZCZJCG038); 黑龙江省中医药科研项目 (ZHY2024-239); 2025 年度黑龙江省省属本科高校基本科研业务费项目资助 (2025-KYYWF-ZR0101)

作者简介: 辛国松 (1984—), 男, 研究员, 博士 (博士后), 研究方向为抗肿瘤中药药理学研究。E-mail: 13766801150@163.com

\*通信作者: 李海茹 (1988—), 女, 副教授, 博士 (博士后), 研究方向为中药药理学。E-mail: lihairu0419@126.com

( $P < 0.01$ ), increased intracellular and mitochondrial ROS, MDA and  $Fe^{2+}$  levels ( $P < 0.01$ ), aggravated lipid peroxidation, reduced mitochondrial membrane potential ( $P < 0.01$ ), enhanced mitochondrial membrane permeability ( $P < 0.01$ ), upregulated HO-1, p53, GSK-3 $\beta$  and VDAC1 expressions ( $P < 0.01$ ), downregulated Nrf2, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt expressions ( $P < 0.01$ ). Knockdown of *PRDX1* gene significantly amplified these effects of tetrandrine ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Tetrandrine induces mitochondria-associated ferroptosis in MCF-7 cells via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway, with PRDX1 playing a critical regulatory role.

**Key words:** tetrandrine; PRDX1; breast cancer; ferroptosis; PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway

乳腺癌是全球范围内高发的恶性肿瘤之一。根据 2022 年全球癌症统计数据, 乳腺癌新发病例达 231 万例, 占有恶性肿瘤发病总数的 11.6%, 位居女性恶性肿瘤发病率第 2 位, 仅次于肺癌 (12.4%)。同年全球乳腺癌死亡病例为 66 万例, 占癌症总死亡人数的 6.9%, 位列全球癌症死亡原因第 4 位<sup>[1]</sup>。目前乳腺癌的主要治疗方式包括手术切除、放射治疗、化学治疗和免疫治疗, 然而这些治疗手段面临治疗耐药性、肿瘤微环境免疫抑制以及治疗成本高昂等多重挑战, 导致临床疗效受限。因此, 开发能够有效抑制乳腺癌增殖与转移的靶向治疗策略, 从而降低患者死亡率, 始终是乳腺癌基础研究的重要方向。

近年来, 铁死亡作为一种新型程序性细胞死亡形式, 主要由铁依赖性脂质过氧化驱动, 在多种女性相关疾病的发生发展中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。铁死亡与癌症治疗及克服肿瘤微环境中的获得性耐药机制密切相关。研究发现, 乳腺癌细胞对氧化应激诱导的铁死亡表现出高度敏感性, 为将铁死亡作为乳腺癌治疗靶点提供了坚实的科学依据。铁死亡的典型特征表现为细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和  $Fe^{2+}$  异常蓄积、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平下降以及脂质过氧化反应增强<sup>[3]</sup>。其中, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 为 ROS 介导的脂质过氧化损伤的重要间接标志物。研究表明, 铁死亡诱导剂 Erastin 可通过显著提高线粒体 ROS 水平, 有效诱导多种癌症发生铁死亡。过氧化物还原酶 1 (peroxiredoxin 1, PRDX1) 是肿瘤细胞铁死亡的关键负调控因子<sup>[4]</sup>。因此, 通过靶向调控 PRDX1 功能来调节铁死亡过程, 为肿瘤治疗提供了新的潜在策略。

天然来源的生物碱类化合物通过选择性作用于关键信号传导通路, 在乳腺癌创新治疗领域展现出广阔的应用前景。防己属植物含有丰富的生物碱成分, 在传统中医药实践中被广泛应用并表现出显著的抗肿瘤活性<sup>[5-6]</sup>。本研究采用网络药理学与分子对接技术相结合的方法, 系统筛选防己活性生物碱

成分中抗乳腺癌的关键靶点及作用通路, 并将筛选获得的活性成分粉防己碱与磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、糖原合成激酶-3 $\beta$  (glycogen synthesizing kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 和 PRDX1 等潜在靶蛋白进行分子对接实验, 验证其作为关键靶点的合理性。进一步通过体外实验深入阐明粉防己碱对乳腺癌的抗肿瘤活性, 及其通过 PRDX1/PI3K/GSK-3 $\beta$  信号通路诱导铁死亡的具体作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人乳腺癌 MCF-7 细胞由国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心提供, 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

### 1.2 药品与试剂

粉防己碱 (质量分数  $\geq 98\%$ , 批号 L1607039) 购自阿拉丁试剂有限公司; MTT (批号 MA0218)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (批号 MA0220-Nov-19G)、MDA 试剂盒 (批号 A003-1-2)、ROS 试剂盒 (批号 011124240625) 购自美伦生物技术有限公司;  $Fe^{2+}$  试剂盒 (批号 2406006)、线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 240011010)、线粒体膜孔检测试剂盒 (批号 240140006) 购自碧云天生物技术有限公司; Hoechst 33258 染色液 (批号 B1062-50) 购自北京普利莱基因技术有限公司; PI 染液 (批号 C0080) 购自北京索莱宝科技有限公司; PRDX1 siRNA (批号 PA20210508007) 购自南京凯基生物有限公司; 兔抗 PRDX1 抗体 (批号 AH11286403)、PI3K 抗体 (bs-2904R)、p-PI3K 抗体 (批号 bs-7913R)、Akt 抗体 (批号 T06060003)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 BC10268988) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗 p-Akt 抗体 (批号 3600003598)、电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) 抗体 (批号 3523071207)、GSK-3 $\beta$  抗体 (批号

5500038185)、p53 抗体(批号 4000400043)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(批号 3522110806)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔抗核转录因子 E2 相关因子(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)抗体(批号 T05162135)、HRP 标记的抗兔 IgG 抗体(批号 WLA068a)购自沈阳万类生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

CKX-41 型荧光显微镜(德国 Leica 公司); ECO-170P-230 型细胞培养箱、Model 680 型酶标仪(美国 NBS 公司); Adventurer 型万分之一电子天平(美国 OHAUS 公司); CKX-41-32 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Anke TDL80-2C 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Optima L-100XP 型低温高速离心机、EPICS-XL 型流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司); Azure Biosystems C500 型近红外成像系统(北京深蓝云生物科技有限公司); 680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); DYY-7C 型电泳仪、M344039 型垂直电泳转印槽(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

### 2.1 MTT 法检测细胞活力

将粉防己碱粉末用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解,配制成 10 mg/mL 的储备液,分装后于 -20 °C 避光保存。实验前用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基稀释成 1、2、4、8、16、32  $\mu\text{g/mL}$  的给药溶液, DMSO 终体积分数均不超过 0.1%,以排除溶剂对细胞活性的影响。

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h。给予粉防己碱处理 48 h,对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液(5 mg/mL),孵育 4 h。加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解甲臞晶体,使用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度(A)值,并计算半数抑制浓度(half inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。

### 2.2 转染实验

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,当细胞融合度达到 30%~50%时,设置对照组和 siPRDX1 组。使用  $1 \times \text{riboFECTTMCP}$  Buffer 稀释 PRDX1 siRNA 储存液,加入 riboFECTTMCP Reagent 混合均匀,室温孵育 15 min,形成转染复合物。随后将转染复合物加入无双抗的完全培养基中,使其终浓度为 100 nmol/L,于培养箱培养 24~96 h。

### 2.3 细胞凋亡情况的检测

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,设置对照组及粉防己碱(10、20  $\mu\text{g/mL}$ )组和粉防己碱(20  $\mu\text{g/mL}$ ) + siPRDX1 组。细胞转染后,给予粉防己碱处理 48 h,对照组加入不含药物的培养基。加入 Hoechst 33258 和 PI 染色液,避光孵育后,于荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image J 软件分析双染细胞数和总细胞数,计算细胞凋亡率。同时,采用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 2.4 划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力

**2.4.1 划痕实验** 当细胞融合度达到 70%~80% 时,使用无菌 200  $\mu\text{L}$  移液枪头在 6 孔板的底部垂直划痕,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h,于倒置显微镜下观察并拍照。

**2.4.2 Transwell 实验** 24 孔板内插入 8  $\mu\text{m}$  孔的 Transwell 小室,小室内加入 400  $\mu\text{L}$  细胞悬液,下室加入 700  $\mu\text{L}$  含 12% 胎牛血清的完全培养基。按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h,去除未侵袭的细胞,反面细胞用甲醇固定并用结晶紫染,于倒置显微镜下观察并拍照,统计侵袭细胞数。

### 2.5 细胞内 MDA 和 $\text{Fe}^{2+}$ 水平的检测

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。收集细胞,按照试剂盒说明书检测 MDA 和  $\text{Fe}^{2+}$  水平。

### 2.6 细胞及线粒体内 ROS 水平的检测

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。收集细胞, PBS 洗涤后,加入 DCFH-DA 和 MitoSOX 染液, 37 °C 避光孵育 15 min,于荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.7 线粒体膜电位水平的检测

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。收集细胞, PBS 洗涤后,加入 JC-1 荧光探针, 37 °C 避光孵育 20 min,于荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.8 线粒体膜孔通透性的检测

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。收集细胞, PBS 洗涤后,加入 Calcein-AM 和荧光猝灭剂, 37 °C 避光孵育 30 min。然后更换为 37 °C 预热的培养基,避光孵育 30 min,以保证细胞内酯酶充分水解 Calcein-AM 以生成绿色荧光的 Calcein。

于荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.9 Western blotting 检测 PRDX1、VDAC1、p53、PI3K/Akt/GSK-3β 通路和 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。收集细胞,加入含 PMSF 的细胞裂解液,离心取上清,煮沸 10 min 使蛋白变性,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。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,封闭,加入一抗,4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜后,加入二抗,37 °C 孵育

2 h,洗膜后加入化学发光试剂,采用凝胶成像系统进行可视化分析。

### 2.10 qRT-PCR 检测 PRDX1、VDAC1、p53、PI3K/Akt/GSK-3β 通路和 Nrf2/HO-1 通路相关基因表达

将 MCF-7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,按“2.3”项下方法进行分组和给药,培养 48 h。收集细胞,加入 TRIzol 试剂提取总 RNA。按照试剂盒说明书合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因            | 上游引物序列 (5'-3')            | 下游引物序列 (5'-3')           |
|---------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>GAPDH</i>  | ACACCCACTCCTCCACCTTGG     | TCCACCACCCTGTTGCTGTAG    |
| <i>VDAC1</i>  | ACAGAGTTTGGCGGCTCCATTAC   | GAAGCAGGCGTCAGGGTCAATC   |
| <i>HO-1</i>   | TAGAAGGGCGGCGGTCATCG      | CGAACCTCATCTCTCCACGAACC  |
| <i>PI3K</i>   | ATGGTGAGGCGGAGGACAGTG     | TGCTGTCGTTTCGTCATCATCAC  |
| <i>Akt</i>    | CAAGCCTCAGGTGACATCCGATACT | GCGGCGTCAACTCCACACTC     |
| <i>PRDX1</i>  | TGTGTTGGGACTGCTGATAGG     | GCTGTGGCTTTGAAGTTGGG     |
| <i>p53</i>    | GGAAGCCGCCGAAGAAGATGAG    | GCTATCATTGCTCTCCGTGTCCTC |
| <i>GSK-3β</i> | GACAGTGGTGTGGATCAGTTGGTG  | TCCTGCTCCTGGTGAGTCCTTGG  |
| <i>Nrf2</i>   | TCCAAGTCCAGAAGCCAAACTGAC  | GGAGAGGATGCTGCTGAAGGAATC |

### 2.11 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,多样本均数比较采用 One-way ANOVA 分析,通过 Graphpad Prism 8 软件绘制图表。

## 3 结果

### 3.1 粉防己碱对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

如图 1 所示,1~32  $\mu\text{g/mL}$  粉防己碱显著抑制 MCF-7 细胞活力 ( $P < 0.01$ ),且呈剂量相关性。粉

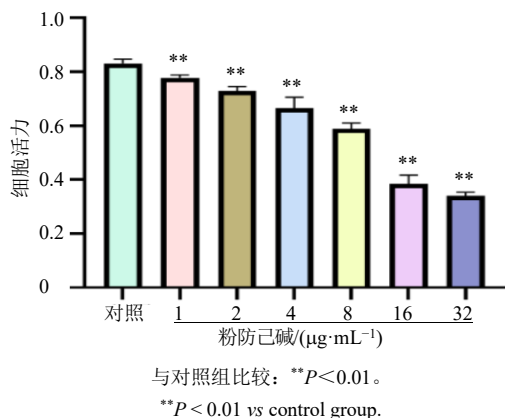


图 1 粉防己碱对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Tetrandrine inhibits proliferation of MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

防己碱对 MCF-7 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为  $15.31 \mu\text{g/mL}$ ,因此后续给药质量浓度设定为 10、20  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 3.2 PRDX1 siRNA 转染结果与敲低 PRDX1 增强粉防己碱对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用

采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测未经处理的 MCF-7 细胞和经过 PRDX1 siRNA 瞬时转染的 MCF-7 细胞中 PRDX1 蛋白和 mRNA 表达,如图 2-A~C 所示,经过 PRDX1 siRNA 瞬时转染的 MCF-7 细胞中 PRDX1 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),证明转染成功。进一步给予粉防己碱干预,如图 2-D 所示,对照组细胞贴壁状态良好、密度较高,呈正常生长状态;粉防己碱组细胞数量减少、部分出现皱缩,呈现早期凋亡特征,且呈剂量相关性;在敲低 PRDX1 基因后,细胞生长变稀疏,细胞间隙增大,细胞膜出现破裂现象,细胞轮廓模糊,细胞核固缩。采用 Hoechst 33258/PI 双染法检测细胞凋亡情况,如图 2-E、G 所示,对照组细胞核呈现均匀蓝色荧光,且 PI 染色为阴性;粉防己碱组细胞染色质凝集,细胞膜完整性被破坏,细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ );与粉防己碱组比较,粉防己碱+siPRDX1 组细胞凋亡率进一步显著升高

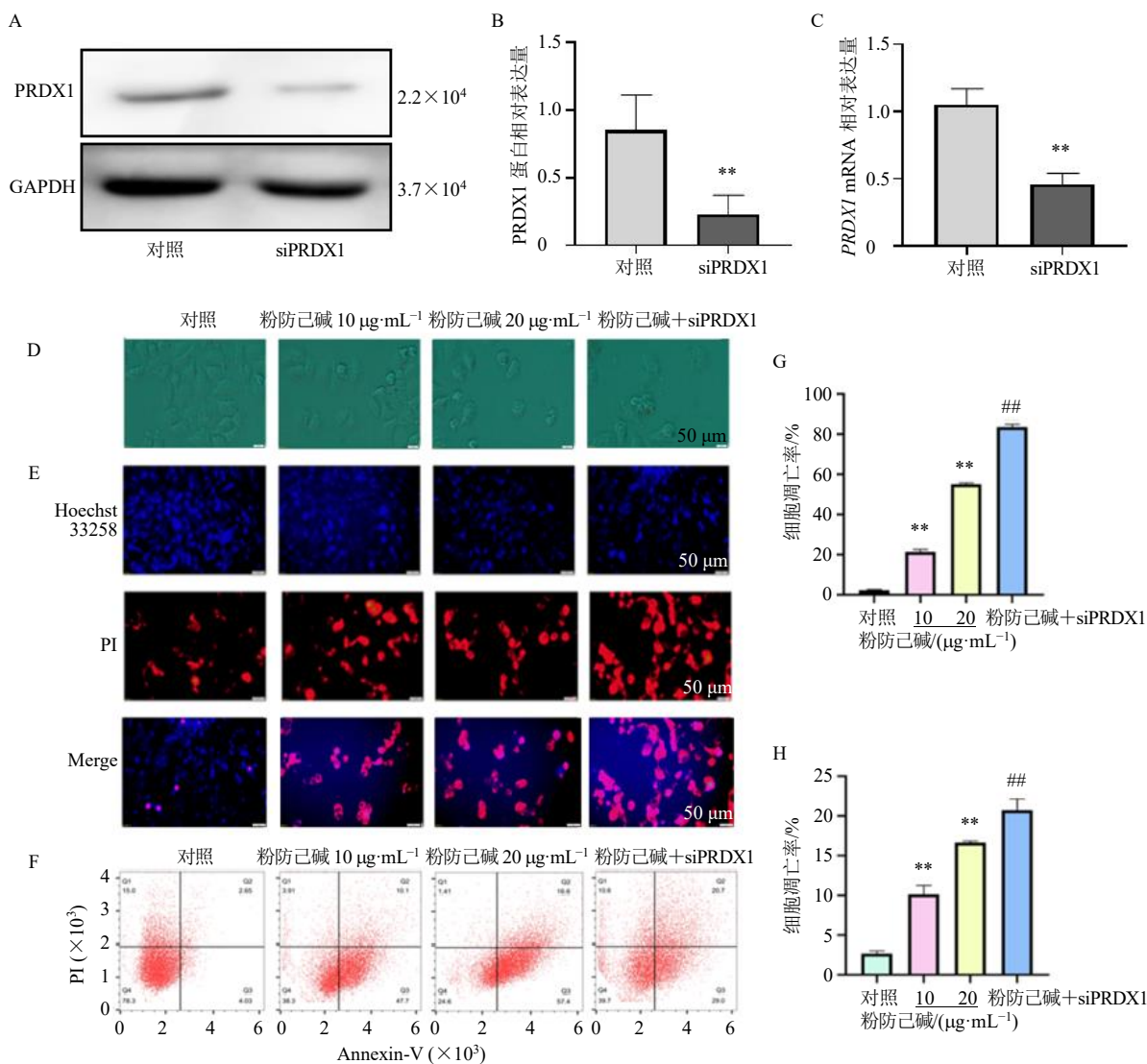


图 2 敲低 PRDX1 增强粉防己碱对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
**Fig. 2** Knockdown of PRDX1 enhances induction of apoptosis by tetrandrine in MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A~C-Western blotting 和 qRT-PCR 检测 PRDX1 蛋白和 mRNA 表达; D-倒置显微镜观察细胞形态 (×400); E、G-Hoechst/PI 双染检测细胞凋亡 (×200); F、H-流式细胞术检测细胞凋亡率; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与粉防己碱 (20 μg·mL<sup>-1</sup>) 组比较: ## $P < 0.01$ , 下同。  
 A~C-expressions of PRDX1 protein and mRNA detected by Western blotting and qRT PCR; D-cell morphology observed by inverted microscope (× 400); E, G-cell apoptosis detected by Hoechst/PI double staining (× 200); F, H-cell apoptosis rate detected by flow cytometry; \*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs tetrandrine (20 μg·mL<sup>-1</sup>) group, same as below figures.

图 2 敲低 PRDX1 增强粉防己碱对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Fig. 2** Knockdown of PRDX1 enhances induction of apoptosis by tetrandrine in MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

( $P < 0.01$ )。流式细胞术结果 (图 2-F、H) 与 Hoechst 33258/PI 双染结果一致。以上结果表明, PRDX1 是粉防己碱诱导 MCF-7 细胞凋亡的关键负调控因子, 抑制 PRDX1 可以增强 MCF-7 细胞对粉防己碱的敏感性。

### 3.3 敲低 PRDX1 增强粉防己碱对 MCF-7 细胞侵袭和迁移的抑制作用

如图 3-A、C 所示, 对照组有大量细胞穿过基质胶和滤膜; 粉防己碱组的穿膜细胞数量明显减少 ( $P < 0.01$ ), 敲低 PRDX1 后穿膜细胞数量进一步减

少 ( $P < 0.01$ )。如图 3-B、D 所示, 对照组细胞明显向划痕区域迁移, 粉防己碱组划痕愈合率显著降低 ( $P < 0.01$ ), 敲低 PRDX1 进一步抑制细胞迁移能力 ( $P < 0.01$ )。表明粉防己碱能够有效抑制 MCF-7 细胞的迁移和侵袭, 且 PRDX1 在其中发挥重要的负调控作用。

### 3.4 粉防己碱诱导 MCF-7 细胞铁死亡

铁死亡的核心特征是“铁离子依赖的脂质过氧化”, 如图 4-A、B 所示, 与对照组比较, 粉防己碱显著诱导脂质过氧化终产物 MDA 和铁死亡启动因

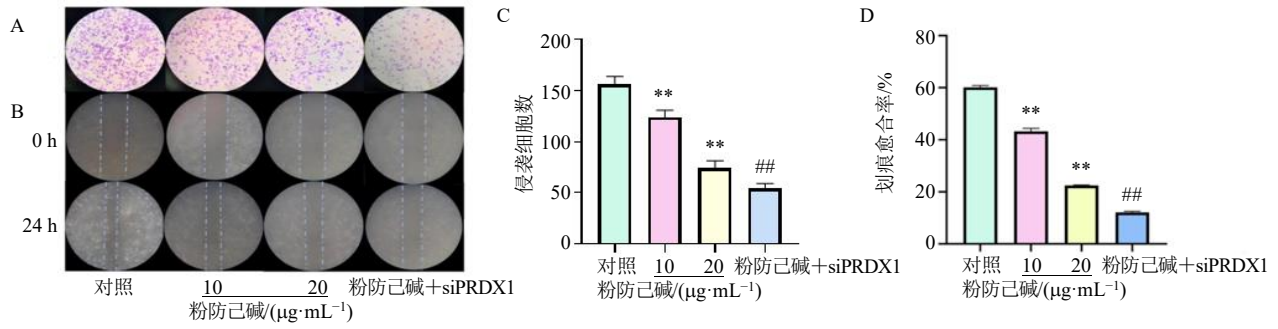
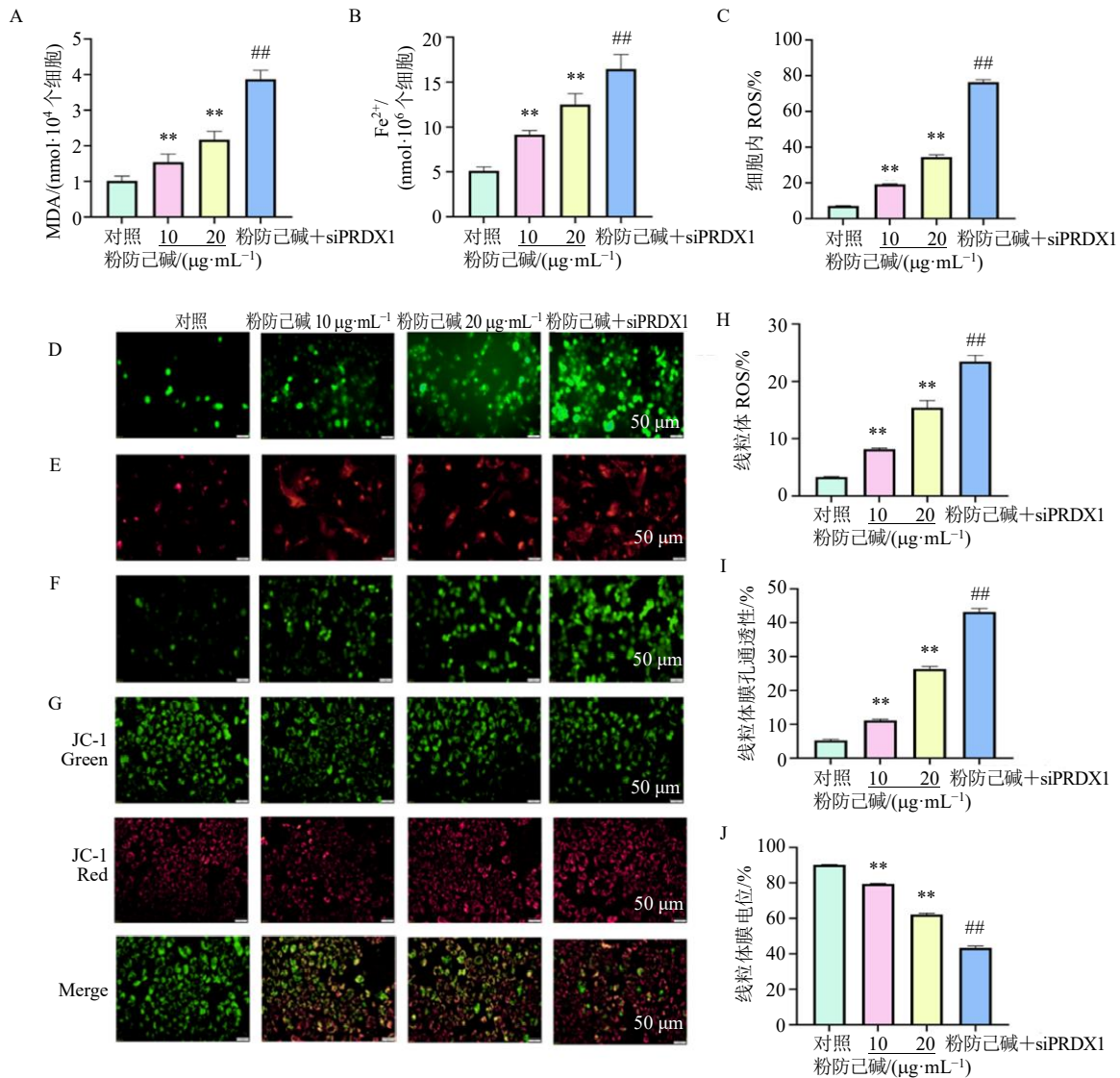


图3 敲低 *PRDX1* 增强粉防己碱对 MCF-7 细胞侵袭 (A、C) 和迁移 (B、D) 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Knockdown of *PRDX1* enhances inhibitory effect of tetrandrine on invasion (A, C) and migration (B, D) in MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-MDA 水平; B-Fe<sup>2+</sup>水平; C、D-细胞内 ROS 水平 (×400); E、H-线粒体 ROS 水平 (×200); F、I-线粒体膜孔通透性 (×200); G、J-线粒体膜电位水平 (×200)。

A-MDA level; B-Fe<sup>2+</sup> level; C, D-ROS level in cells (× 400); E, H-mitochondrial ROS level (× 200); F, I-mitochondrial membrane pore permeability (× 200); G, J-mitochondrial membrane potential level (× 200).

图4 粉防己碱诱导 MCF-7 细胞铁死亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Tetrandrine induces ferroptosis in MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

子 Fe<sup>2+</sup> 累积 ( $P < 0.01$ ), 表明 Fe<sup>2+</sup> 的积累是铁死亡的启动信号和催化中心, 其过量积累是促进脂质过氧化的重要原因。氧化应激是脂质过氧化的直接驱动因素, 而线粒体是 ROS 的主要产生场所。如图 4-C~E、H 所示, 与对照组比较, 粉防己碱诱导细胞及线粒体内 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。如图 4-F、G、I、J 所示, 与对照组比较, 粉防己碱组线粒体膜孔通透性显著升高 ( $P < 0.01$ ), 线粒体膜电位显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明线粒体功能损伤。敲低 PRDX1 基因后给予粉防己碱干预, 可进一步升高 MDA、Fe<sup>2+</sup> 及 ROS 水平 ( $P < 0.01$ ), 增加线粒体膜孔通透性 ( $P < 0.01$ ), 降低线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ ), 表明敲低 PRDX1 可增强粉防己碱诱导的铁死亡效应。

### 3.5 粉防己碱对 MCF-7 细胞中 VDAC1、PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ 通路的影响

PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路是铁死亡的负调

控通路, 在恶性肿瘤中, 其活化不仅能促进细胞增殖、抑制凋亡, 还可通过抑制铁死亡, 使肿瘤细胞逃避铁死亡诱导的杀伤<sup>[7]</sup>。GSK-3 $\beta$  作为 PI3K/Akt 通路的下游靶分子<sup>[8]</sup>, 也是调控铁死亡的关键蛋白, 其活化可以促进细胞氧化应激、线粒体功能损伤。VDAC1 是位于线粒体外膜的孔道蛋白, 主要负责介导线粒体与细胞质的代谢物及离子的跨膜运输, 维持线粒体物质交换与能量代谢稳定。VDAC1 高表达水平标志着线粒体功能的损伤, 从而导致线粒体内 ROS 大量蓄积、降低线粒体膜的稳定性, 促进细胞内游离铁离子的释放与脂质过氧化物生成, 从而诱导细胞发生铁死亡<sup>[9]</sup>。Western blotting 结果 (图 5-A~D) 显示, 与对照组比较, 粉防己碱显著下调 PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 的蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), 上调 GSK-3 $\beta$  和 VDAC1 的蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量相关性, qRT-PCR

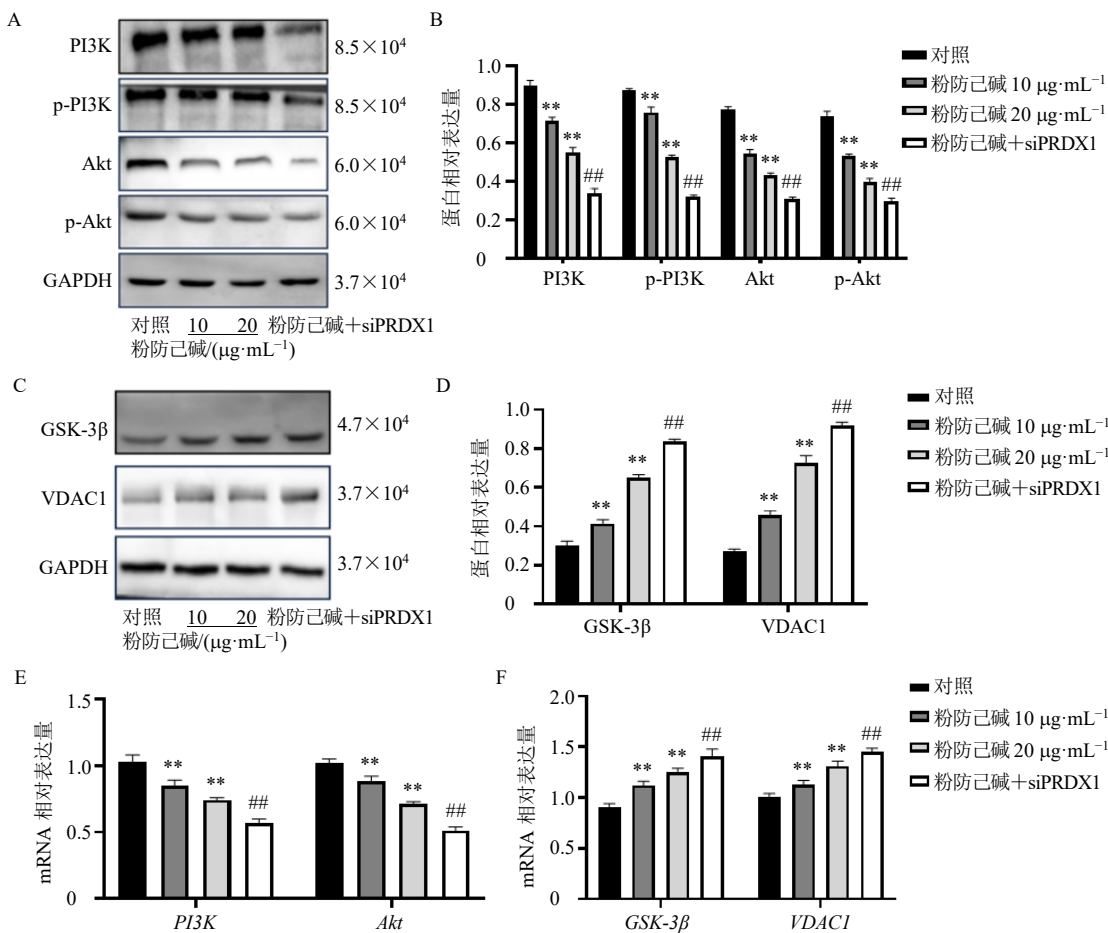


图 5 粉防己碱对 MCF-7 细胞中 VDAC1、PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  通路相关蛋白 (A~D) 和 mRNA (E, F) 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of tetrandrine on expressions of VDAC1 and PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway-related proteins (A—D) and mRNA (E, F) in MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

结果(图 5-E、F)与 Western blotting 结果一致,表明粉防己碱可通过靶向抑制 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路,一方面阻断其介导的肿瘤细胞增殖促进与凋亡抑制作用,另一方面通过上调下游 GSK-3 $\beta$  蛋白及线粒体功能相关蛋白 VDAC1 的表达,诱导细胞线粒体结构与功能损伤,进而促进细胞内 Fe<sup>2+</sup>过载、脂质过氧化累积等诱导肿瘤细胞发生铁死亡;而敲降 PRDX1 基因可进一步增强粉防己碱对 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  通路的调控作用及对铁死亡的诱导效应 ( $P < 0.01$ )。

### 3.6 粉防己碱对 MCF-7 细胞中 p53、Nrf2/HO-1 通路的影响

Nrf2 是细胞内重要的抗氧化应激的核心调控

分子,也是 HO-1 的上游转录过程发挥负向调控作用。p53 作为抑癌蛋白,可通过抑制铁离子转运、增强脂质过氧化等途径,促进铁死亡的发生。Western blotting 结果(图 6-A、B)显示,与对照组比较,粉防己碱显著下调 Nrf2 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ),上调 HO-1 和 p53 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ),促进铁离子释放与脂质过氧化,诱导 MCF-7 细胞铁死亡。敲低 PRDX1 基因后给予粉防己碱干预,可进一步下调 Nrf2 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ),上调 HO-1 和 p53 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。qRT-PCR 结果(图 6-C)与 Western blotting 结果一致。表明 PRDX1 可介导粉防己碱对 Nrf2、HO-1 及 p53 蛋白表达的调控作用,进而参与细胞抗氧化应激与铁死亡相关信号通路的调节。

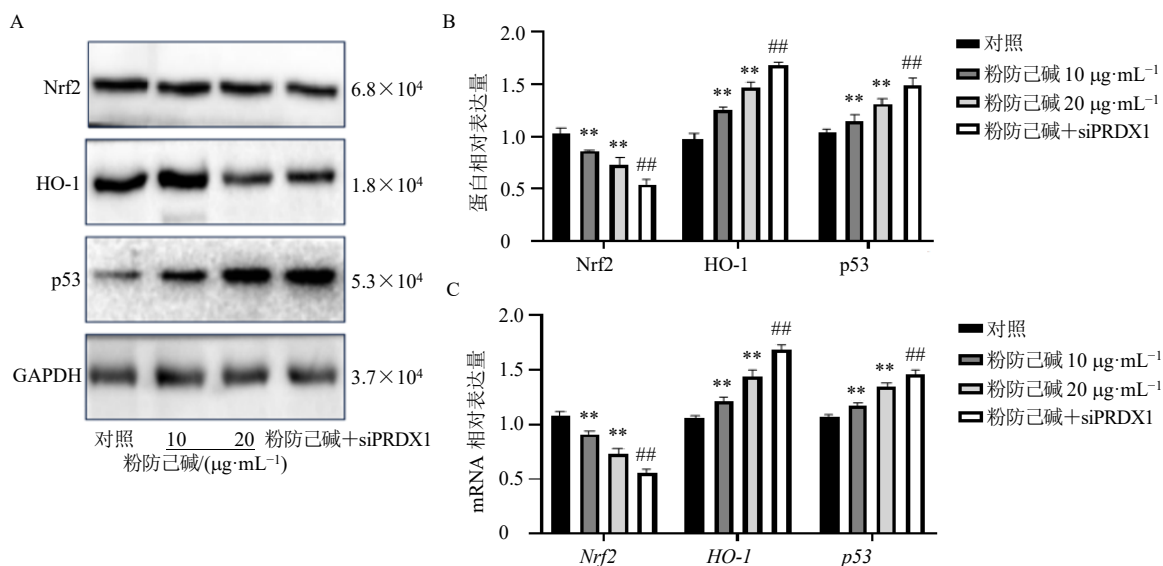


图 6 粉防己碱对 MCF-7 细胞中 p53、Nrf2/HO-1 通路相关蛋白 (A, B) 和 mRNA (C) 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of tetrandrine on expressions of p53 and Nrf2/HO-1 pathway-related proteins (A, B) and mRNA (C) in MCF-7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

乳腺癌是源于乳腺上皮细胞异常增生所形成的一类异质性极强的恶性肿瘤,严重威胁女性群体的生命健康<sup>[10]</sup>,其发病与遗传因素、内分泌紊乱、环境与生活方式和乳腺癌良性病史等多因素密切相关<sup>[11]</sup>。尽管手术切除、化疗及放疗等传统治疗方式在一定程度上改善了患者预后,但仍面临治疗相关不良反应、耐药性产生以及肿瘤微环境免疫抑制等诸多挑战。中医药通过“扶正祛邪”理论所筛选的天然活性成分,因其多靶点作用机制和相对较低的不良反应,为开发新型乳腺癌治疗策略提供了重要研究方向<sup>[12]</sup>。

粉防己碱又称为汉防己甲素,是从防己科植物粉防己根部提取的双苜基异喹啉类生物碱。近年

来,已有研究证明粉防己碱对多种肿瘤在体外和体内具有抑制作用,如粉防己碱可以改善肺泡上皮细胞衰老,缓解肺纤维化<sup>[13]</sup>,通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) /核因子- $\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) 通路改善心室重塑和炎症<sup>[14]</sup>、通过共价靶向抑制醛固酮合成,减轻高血压<sup>[15]</sup>等。在肿瘤研究领域,粉防己碱能够通过阻滞细胞周期进程、诱导细胞凋亡及调节自噬水平等多种途径,抑制多种恶性肿瘤的进展。然而,粉防己碱是否能够调控铁死亡及其具体作用靶点与分子机制,仍有待深入研究。

铁死亡作为铁依赖的脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡方式,已成为乳腺癌治疗的潜在分子靶

点<sup>[16]</sup>。现有关于诱导铁死亡治疗乳腺癌研究多围绕谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 等靶点, 研究机制主要在于胱氨酸转运、脂质过氧化物还原等胞质内抗氧化作用<sup>[17]</sup>。而线粒体作为铁代谢与氧化应激的核心细胞器, 在铁死亡调控中同样具有关键作用<sup>[18]</sup>。线粒体外膜的通道蛋白 VDAC 可介导铁离子外流, 其异常开放会进一步加剧胞质铁过载。Nrf2 与 p53 在此过程中发挥着相反的调控作用: Nrf2 可通过转录激活 HO-1 等抗氧化基因, 减轻氧化应激并拮抗铁死亡<sup>[19]</sup>; 而 p53 可通过增强 VDAC1 介导的铁释放, 促进铁离子蓄积与脂质过氧化, 进而推进铁死亡进程<sup>[20]</sup>。

PRDX1 作为细胞内重要的抗氧化酶, 可清除过量 ROS 以维持氧化还原稳态。研究显示, PRDX1 的过表达使得肿瘤细胞免受 ROS 诱导的氧化应激损伤, 促进恶性转化, 并增强肿瘤对化疗和放疗的抵抗<sup>[21]</sup>。因此, 靶向抑制 PRDX1 是破坏肿瘤细胞氧化还原稳态进而杀伤肿瘤的有效策略之一。PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  通路是调控乳腺癌进展的经典信号通路, 广泛参与细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭等生物学行为调控<sup>[22]</sup>。该通路激活后, Akt 可通过磷酸化抑制 GSK-3 $\beta$  活性<sup>[23]</sup>。本研究结果显示, 粉防己碱呈剂量相关性地抑制 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭并诱导凋亡。同时, 粉防己碱显著升高细胞内 ROS、丙二醛及 Fe<sup>2+</sup> 水平, 导致铁离子稳态失衡, 上述指标变化与铁死亡核心标志物 GSH、GPX4 等的典型表达规律相一致, 表明粉防己碱可以诱导 MCF-7 细胞发生铁死亡<sup>[24]</sup>。敲低 PRDX1 基因后, 可显著增强粉防己碱对 MCF-7 细胞的抗肿瘤效应。由此可见, PRDX1 是粉防己碱抗乳腺癌的关键作用靶点。进一步机制研究证实, 粉防己碱可通过下调 PRDX1 抑制 PI3K/Akt 通路过度活化, 拮抗对 GSK-3 $\beta$  的抑制, 进而加剧细胞脂质过氧化与线粒体的损伤, 最终诱导乳腺癌细胞发生铁死亡。在分子水平上, 粉防己碱上调促铁死亡相关蛋白 HO-1、p53 表达, 下调抗铁死亡相关蛋白 Nrf2 表达, 同时抑制 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  通路活化并上调 VDAC1 表达, 多靶点协同促进铁死亡发生。敲低 PRDX1 基因后, 进一步增强粉防己碱诱导铁死亡效应。

综上, 粉防己碱可通过调控 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路, 诱导 MCF-7 细胞发生线粒体相关性铁死亡, 并明确了 PRDX1 在其中的关键调控作用。本研究不仅为开发靶向 PRDX1 的天然抗肿瘤药物

提供了实验依据, 也为基于铁死亡的乳腺癌防治研究提供了新的思路与理论基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 郭昊, 吕青. 全球及中国乳腺癌的流行病学趋势及防控启示: 2018—2022 年《全球癌症统计报告》解读 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31(7): 796-802.
- [2] 刘春东, 雷小楠, 樊清睿, 等. 铁死亡在肿瘤相关的研究进展 [J]. 临床医学进展, 2025, 15(5): 2099-2109.
- [3] 姜煜资, 聂红明. 中药调控铁死亡治疗代谢功能障碍相关脂肪性肝病的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(3): 94-100.
- [4] 李红净, 马艳霞, 郭俊花, 等. PLOD2、PRDX6 在膀胱癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2025, 40(1): 64-70.
- [5] 刘婧雯, 王冰, 张宁, 等. 防己化学成分及其抗肿瘤、抗炎作用等研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2025, 59(11): 85-92.
- [6] 辛国松, 刘禹含, 侯妍秀, 等. 基于 GSDMD 基因介导 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路的粉防己碱诱导三阴性乳腺癌细胞焦亡机制研究 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6657-6666.
- [7] 吴永晖. 过表达 FSP1 通过 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  通路抑制铁死亡减轻 PC12 细胞的缺血再灌注损伤 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2023.
- [8] 姚佳敏, 吴春明, 欧阳钦. TLR4 通过 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  通路对人 HL-7702 肝细胞凋亡的影响 [J]. 中国医药导报, 2025, 22(17): 24-28.
- [9] 张剑. SYNJ2BP 通过调控 IP3R1/GRP75/VDAC1 介导线粒体钙超载促进线粒体功能障碍及骨骼肌萎缩的机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2025.
- [10] 王晓稼, 赵颖馨. 2024 年乳腺癌领域中国创新药临床研究进展 [J]. 浙江医学, 2025, 47(21): 2241-2247.
- [11] 张雪, 董晓平, 管雅喆, 等. 女性乳腺癌流行病学趋势及危险因素研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(1): 87-92.
- [12] 王晓羽, 侯佳佳, 牛阳. 中医治疗乳腺癌术后康复期临证经验 [J]. 光明中医, 2024, 39(13): 2682-2685.
- [13] Chu L H, Zhuo J Z, Huang H H, et al. Tetrandrine alleviates pulmonary fibrosis by inhibiting alveolar epithelial cell senescence through PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 969: 176459.
- [14] Wang Y, Zhang R Y, Li J M, et al. Tetrandrine improves ventricular remodeling and inflammation via inhibition of the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Heart J*, 2025, 66(3): 463-474.
- [15] Chu S M, Yang W, Lu Y J, et al. Tetrandrine inhibits

- aldosterone synthesis by covalently targeting CYP11A1 to attenuate hypertension [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1387756.
- [16] 张本常, 王泽宇, 苟红艳, 等. 铁死亡与双硫死亡在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(1): 114-123.
- [17] 朱明美, 于宛鹭, 徐红月, 等. 芝麻素通过 p53/SLC7A11/GPX4 轴诱导三阴性乳腺癌细胞铁死亡 [J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(11): 2019-2025.
- [18] 练旭冬. Prx1介导 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路调控 MDA-MB-436 细胞铁死亡机制研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2023.
- [19] 汪卫欣, 李琳霏, 杨笔猜, 等. 基于 Nrf2/xCT/GPX4 通路的乳复方诱导乳腺癌细胞铁死亡作用机制研究 [J]. 亚太传统医药, 2026, 22(1): 17-29.
- [20] Liu J, Zhang C, Wang J M, *et al*. The regulation of ferroptosis by tumor suppressor p53 and its pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8387.
- [21] 庞艳婷, 孙青葵, 张卫东. 靶向 PRDX1 的抗肿瘤天然产物研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, 56(9): 1109-1117.
- [22] 徐文芳. TRIM34 通过 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  信号通路影响乳腺癌细胞的增殖和凋亡 [D]. 承德: 承德医学院, 2025.
- [23] Zhong W, Darmani N A. Role of PI3K/Akt/GSK-3 pathway in emesis and potential new antiemetics [J]. *J Cell Signal*, 2020, 1(4): 155-159.
- [24] 张琪, 计泽朝, 加沙尔·阿拜, 等. 铁抑制素-1抑制丙酮醛诱导的小鼠肺泡巨噬细胞铁死亡 [J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(12): 2443-2448.

[责任编辑 李亚楠]