

葫芦素 B 通过核因子 E2 相关因子 2/溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4 信号通路诱导舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞铁死亡

林健辉 蒋文芮 韩瑞 刘新伟 张靓 周美云 徐锦程

蚌埠医科大学第一附属医院口腔科 蚌埠 233004

[摘要] 目的 观察葫芦素 B (CuB) 是否诱导舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞铁死亡, 并探讨其可能的机制。方法 采用不同浓度的 CuB (0、5、10、15、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 处理 CAL-27 细胞, 使用细胞计数试剂盒 (CCK) -8 法检测细胞增殖活力, 并计算半数抑制浓度 (IC_{50}); 细胞克隆实验、细胞划痕实验用于检测不同浓度 CuB 对 CAL-27 细胞增殖、迁移的影响; 采用不同浓度 CuB 处理 CAL-27 细胞, 分别检测细胞内活性氧 (ROS)、 Fe^{2+} 、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 的含量变化; 蛋白印迹法 (WB) 检测核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 及谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白的表达水平。结果 CCK-8 结果显示: 5、10、15、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuB 能显著抑制 CAL-27 细胞增殖活力, IC_{50} 为 13.93 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$)。平板克隆实验显示: CuB 能够抑制 CAL-27 细胞的克隆形成能力 ($P < 0.01$)。划痕实验显示: 葫芦素显著缩短 CAL-27 细胞的迁移距离抑制迁移能力 ($P < 0.01$)。ROS、GSH、MDA 及 Fe^{2+} 测定结果显示: 与对照组相比, 不同浓度 CuB 干预后 CAL-27 细胞中 ROS、 Fe^{2+} 的荧光强度显著增强, 且细胞内 GSH 含量明显下降, MDA 含量则明显上升, 诱导细胞氧化损伤, 而以上变化可被铁死亡抑制剂铁抑素-1 (Ferrostatin-1) 逆转 ($P < 0.01$)。WB 结果显示: 不同浓度 CuB 干预后能够显著下调 Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 且铁死亡抑制剂 Fer-1 可逆转 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 CuB 可诱导舌鳞状细胞癌 CAL-27 细胞发生铁死亡, 其机制可能与 CuB 通过调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路有关。

[关键词] 葫芦素 B; 铁死亡; 舌鳞状细胞癌; 核因子 E2 相关因子 2/溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4 信号通路

[中图分类号] R782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2026213



本文链接

OSID 码

Cucurbitacin B induces ferroptosis in CAL-27 cells derived from tongue squamous cell carcinoma through the signaling pathway involving nuclear factor erythroid 2-related factor 2, solute carrier family 7 member 11, and glutathione peroxidase 4

Lin Jianhui, Jiang Wenrui, Han Rui, Liu Xinwei, Zhang Liang, Zhou Meiyun, Xu Jincheng

Dept. of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China

Supported by: Natural Science Research Projects of Colleges and Universities in Anhui Province (KJ2021ZD0088)

Correspondence: Xu Jincheng, Email: xjch9999@163.com

[Abstract] Objective This study aims to observe whether Cucurbitacin B (CuB) induces ferroptosis in CAL-27 cells derived from tongue squamous cell carcinoma and explore its possible mechanism. **Methods** CAL-27 cells were treated with different concentrations of CuB (0, 5, 10, 15, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$). Cell proliferation activity was detected using the

cell counting kit-8 (CCK-8) method, and the median inhibition concentration (IC_{50}) was calculated. Cell cloning and wound healing assays were used to detect the effects of different concentrations of CuB on the proliferation and migration of CAL-27 cells. CAL-27 cells

[收稿日期] 2024-11-01; **[修回日期]** 2025-10-20

[基金项目] 安徽省高校自然科学基金项目 (KJ2021ZD0088)

[第一作者] 林健辉, 硕士, Email: 839606085@qq.com

[通信作者] 徐锦程, 主任医师, 硕士, Email: xjch9999@163.com

were treated with different concentrations of CuB, and the changes in intracellular reactive oxygen species (ROS), Fe^{2+} , GSH, and malondialdehyde (MDA) levels were detected. Western blot (WB) was used to detect the expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), glutathione peroxidase 4 (GPX4), and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) proteins. **Results** CCK-8 results showed that CuB at concentrations of 5, 10, 15, 20, and 30 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited the proliferation activity of CAL-27 cells, with an IC_{50} of 13.93 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$). The plate cloning assay demonstrated that CuB inhibited the cloning ability of CAL-27 cells ($P < 0.01$). The wound healing assay revealed that CuB significantly shortened the migration distance of CAL-27 cells and inhibited their migration ability ($P < 0.01$). The results of ROS, GSH, MDA, and Fe^{2+} measurements indicated that, compared with the control group, the fluorescence intensity of ROS and Fe^{2+} in CAL-27 cells significantly increased after CuB intervention at different concentrations. Meanwhile, the intracellular GSH content significantly decreased, and the MDA content significantly increased, which induced cellular oxidative damage. These changes could be reversed by the ferroptosis inhibitor Fer-1 ($P < 0.01$). WB results showed that CuB intervention at different concentrations significantly downregulated the expression levels of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 proteins ($P < 0.05$). Furthermore, the ferroptosis inhibitor Fer-1 reversed the protein expression of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 ($P < 0.05$). **Conclusion** CuB can induce ferroptosis in CAL-27 cells derived from tongue squamous cell carcinoma, and its mechanism may be related to the ability of CuB to regulate the signaling pathway involving Nrf2, SLC7A11, and GPX4.

[Key words] cucurbitacin B; ferroptosis; oral squamous cell carcinoma; nuclear factor erythroid 2-related factor 2/ solute carrier family 7 member 11/glutathione peroxidase 4 signaling pathway

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, 其中舌鳞状细胞癌 (tongue squamous cell carcinoma, TSCC) 尤为常见且预后较差, 它占全球每年新诊断癌症病例的 1.8%^[1]。研究^[2]发现, 饮酒、吸烟及咀嚼槟榔是导致 TSCC 的主要病因, 三者具有协同效应, 目前 TSCC 的治疗方法主要仍是手术治疗、放射治疗 (外照射放射治疗或近距离放射治疗) 和化学治疗 (顺铂、氟尿嘧啶、紫杉醇和多西他赛等药物) 为主。尽管近几十年来使用了各种治疗方法, 但是治疗效果仍不理想, 患者容易产生耐药性, 其 5 年总生存率 (overall survival, OS) 仍约为 50%, 且易引起淋巴结转移及复发^[3], 故寻找新的药物对治疗 TSCC 具有重要意义。

铁死亡是由 Dixon 等^[4]于 2012 年首次提出的一种新型细胞死亡方式, 研究^[5]表明, 铁死亡与细胞自噬和细胞凋亡、细胞焦亡等存在明显不同, 它是一种铁依赖和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 依赖的细胞死亡, 并且伴随细胞形态变化, 包括线粒体嵴减少或消失、线粒体外膜破裂和线粒体膜浓缩, 这些细胞异常是强烈的膜脂过氧化作用导致质膜选择透过性丧失和氧化应激的发生。通过诱导肿瘤细胞发生铁死亡, 可以切断肿瘤的

血液供应, 激发免疫系统的攻击, 并提高肿瘤细胞对其他治疗的反应^[6]。研究^[7-9]表明, 多种实验试剂 (如厄拉斯汀)、已被批准的药物 (如索拉非尼、柳氮磺胺吡啶等) 以及电离辐射和细胞因子均能诱导铁死亡并抑制肿瘤生长。特别是铁死亡诱导剂在联合放化疗及免疫治疗时, 能显著增强抗肿瘤效果^[10]。

葫芦素 B (cucurbitacin B, CuB) 是从葫芦科植物中分离得到的一种活性单体, 具有广泛的生物活性和药理作用。在抗肿瘤研究^[11]中, CuB 已被证实能够通过多种信号通路抑制多种肿瘤的增殖。研究表明, CuB 能够诱导细胞发生铁死亡。例如, 在针对非小细胞肺癌的研究^[12]中, CuB 通过靶向信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路, 促进了癌细胞的铁死亡, 从而抑制了肿瘤的生长。在关于肝癌细胞的研究^[13]中, CuB 也被发现能够诱导细胞铁死亡, 进而抑制肝癌细胞的增殖, CuB 诱导铁死亡的具体机制尚未完全阐明, 但已有一些研究提供了线索。例如, CuB 可能通过降低谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的活性或表达, 促进脂质过氧化物的积累, 从而诱导细胞铁死亡。GPX4 是细胞内唯一能够还原脂质过氧化物的酶, 其失活是铁死

亡发生的关键步骤之一。此外, CuB 还可能通过影响铁代谢、抗氧化体系等其他途径来诱导铁死亡, 这些途径的具体作用机制仍需进一步深入研究。本研究拟探讨 CuB 抑制 TSCC 细胞 CAL-27 的增殖与细胞铁死亡的关系和可能的作用机制, 以期在未来 TSCC 的治疗和新药的开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人 TSCCCAL-27 细胞株, 批号: CL-0265, 购于中国武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 试剂

CuB 分子式: $C_{32}H_{46}O_8$, 浓度 $\geq 99.50\%$; Ferrostatin-1 (MCE 公司, 美国)。杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国); 青-链霉素、结晶紫 (Biosharp 公司, 中国); 细胞计数试剂盒 (cell counting kit, CCK)-8 检测试剂盒 (华晓基因科技有限公司, 中国); ROS 分析试剂盒 (凯基生物技术股份有限公司, 中国); Fe^{2+} 探针 (同仁化学公司, 日本); 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂检测盒、二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂定量盒 (上海碧云天生物科技有限公司, 中国); 抗体核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、GPX4 (武汉三鹰公司, 中国)。

1.3 仪器

细胞恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); 酶标仪 (BioTek 公司, 美国); 电泳槽、电泳仪 (Bio-RAD 公司, 美国); 自动曝光机 (上海天能科技有限公司, 中国); 低速高速离心机 (Eppendorf 公司, 德国), 生物倒置显微镜 (OLYMPUS 公司, 日本)。

1.4 方法

1.4.1 CAL-27 细胞培养

将细胞接种在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素混合溶液的完全培养基中, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中, 待细胞生长至 80%~90% 时传代, 用于后续实验。

1.4.2 细胞增殖活性检测

取对数期 CAL-27 细胞进行细胞计数后, 以每孔 8×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板, 37°C 培养箱中继续培养 24 h, 待细胞过夜贴壁后, 将细胞分为空白组、对照组和药物处理组, 对照组有细胞、加培养基不加药 ($0 \mu\text{mol/L}$), 药物组分别以终浓度为 2.5、5、10、15、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuB 处理细胞 24 h, 向每孔加入 CCK-8 试剂, 将培养板放入培养箱中孵育 2 h, 使细胞与 CCK-8 试剂充分反应后使用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD) 值, 计算细胞存活率, 并用 GraphPad 软件计算半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC50) 值。

1.4.3 细胞迁移能力检测

取对数生长期的 CAL-27 细胞以每孔 4×10^5 个细胞的密度接种到 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后用 200 μL 移液器针尖进行线性划痕, 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 3 遍后拍照, 标记好位置。分别加入浓度为 0、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu B 溶液进行孵育, 持续 24 h 后再次使用倒置显微镜观察相同位置细胞迁移情况并计算细胞划痕愈合率。

1.4.4 细胞克隆能力检测

取对数生长期的 CAL-27 细胞计数后按照每孔 1×10^3 个细胞的密度接种到 6 孔板中, 隔天按照 (0、2.5、5、10、15、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 的 CuB 处理 CAL-27 细胞 24 h 后更换培养基, 后续使用完全培养基培养 14 d, 其间每隔 2~3 d 更换 1 次培养基。当观察到肉眼可见的细胞群落, 并且在显微镜下确认每个克隆团达到 50~80 个细胞时, 终止培养。随后, 使用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 再用无水乙醇固定 20 min。弃去无水乙醇后, 再次用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 然后用 0.1% 的结晶紫溶液染色 10 min。回收结晶紫后, 用低速流动水清洗 6 孔板, 室温下晾干, 最后进行拍照并计算不同浓度细胞的克隆形成数量。

1.4.5 铁死亡相关生化指标检测

收集 CAL-27 细胞, 严格按照相应试剂盒说明书操作, 分别测定细胞 ROS、 Fe^{2+} 、GSH 及 MDA 水平, 并且为进一步验证 CuB 是否诱导 CAL-27 细胞发生铁死亡, 后续用 Fer-1 ($10 \mu\text{mol/L}$) 及 CuB 联合孵育 CAL-27 细胞, 分别测定相关指标。

1.4.6 蛋白印迹法检测铁死亡相关蛋白表达

取对数生长期的 CAL-27 细胞以 4×10^5 接种 6 孔

板中,待细胞过夜贴壁后,按0、2.5、5、10、15、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuB 处理 CAL-27 细胞 24 h。加入放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液,裂解细胞并提取总蛋白。进行电泳将蛋白质分离后进行转膜。再加入 5% 脱脂奶粉封闭后,分别加入 Nrf2、SLC7A-11、GPX4 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入对应二抗孵育 2 h 后,先后置 Tris-盐酸缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline with Tween-20, TBST) 溶液漂洗 10 min 和显色剂中 30 s,将膜置于化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 化学成像系统内进行显影,并用 ImageJ 软件分析各组蛋白条带灰度值,并且为进一步验证 CuB 是否诱导 CAL-27 细胞发生铁死亡,后续用 Fer-1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 及 CuB 联合孵育 CAL-27 细胞,分别测定铁死亡相关蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法

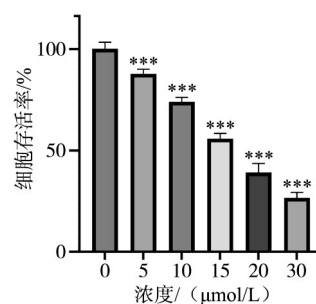
采用 Graph Pad Prism V.10 软件进行单因素方差分析或者 t 检验进行分析,所有数据以至少 3 次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CuB 降低 CAL-27 细胞增殖活性

与对照组相比,随着 CuB 浓度升高,CAL-27 细胞活力逐渐降低,并呈现出剂量依赖性,CuB 作用于 CAL-27 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 13.93 $\mu\text{mol/L}$,

故后续实验选择 0、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 展开 (图 1)。



与对照组相比,*** $P<0.001$ 。

图 1 不同浓度 CuB 对 CAL-27 细胞增殖活性的影响

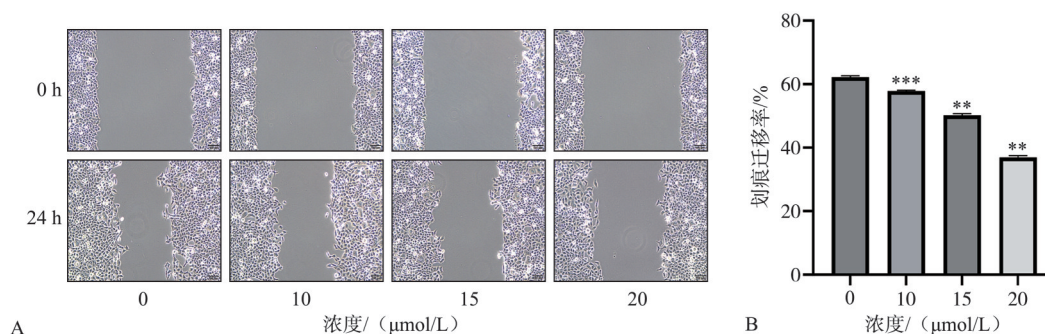
Fig 1 Effects of different concentrations of CuB on the viability of CAL-27 cells

2.2 CuB 抑制 CAL-27 细胞迁移能力

与对照组相比,加入 CuB 处理 24 h 后 CAL-27 细胞的迁移能力明显减弱 ($P<0.01$),对照组和 CuB 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 实验组的迁移率分别为: $62.23\%\pm0.43\%$ 、 $57.85\%\pm0.26\%$ 、 $50.26\%\pm0.47\%$ 、 $36.96\%\pm0.51\%$,并且抑制能力呈现出剂量依赖性 (图 2)。

2.3 CuB 抑制 CAL-27 细胞克隆能力

与对照组相比,随着 CuB 浓度逐渐升高,细胞克隆数明显降低,对照组和 CuB 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的克隆数分别为: (277 ± 4.58) (251.33 ± 5.69) (194.67 ± 6.51) (79.67 ± 4.73) 个,且差异具有统计学意义 ($P<0.001$),可见 CuB 能够显著抑制了 CAL-27 细胞的增殖能力 (图 3)。



A: 各组细胞平板划痕图 (倒置显微镜 $\times 100$); B: 各组细胞平板划痕统计图与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

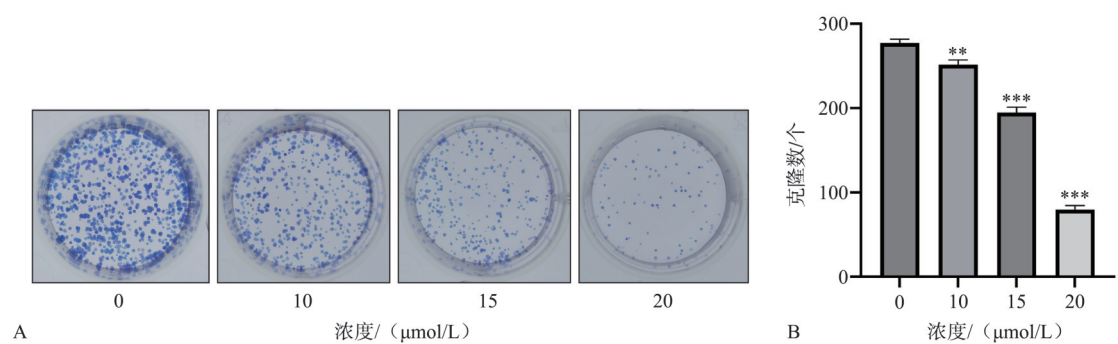
图 2 不同浓度 CuB 对 CAL-27 细胞迁移能力的影响

Fig 2 Effects of different concentrations of CuB on the migration ability of CAL-27 cells

2.4 CuB 增加细胞内 ROS、 Fe^{2+} 、MDA 含量并且降低细胞内 GSH 含量

与对照组比较, CuB (10、15、20 $\mu\text{mol/L}$) 剂量组细胞内 ROS、 Fe^{2+} 的荧光强度明显增强 ($P<$

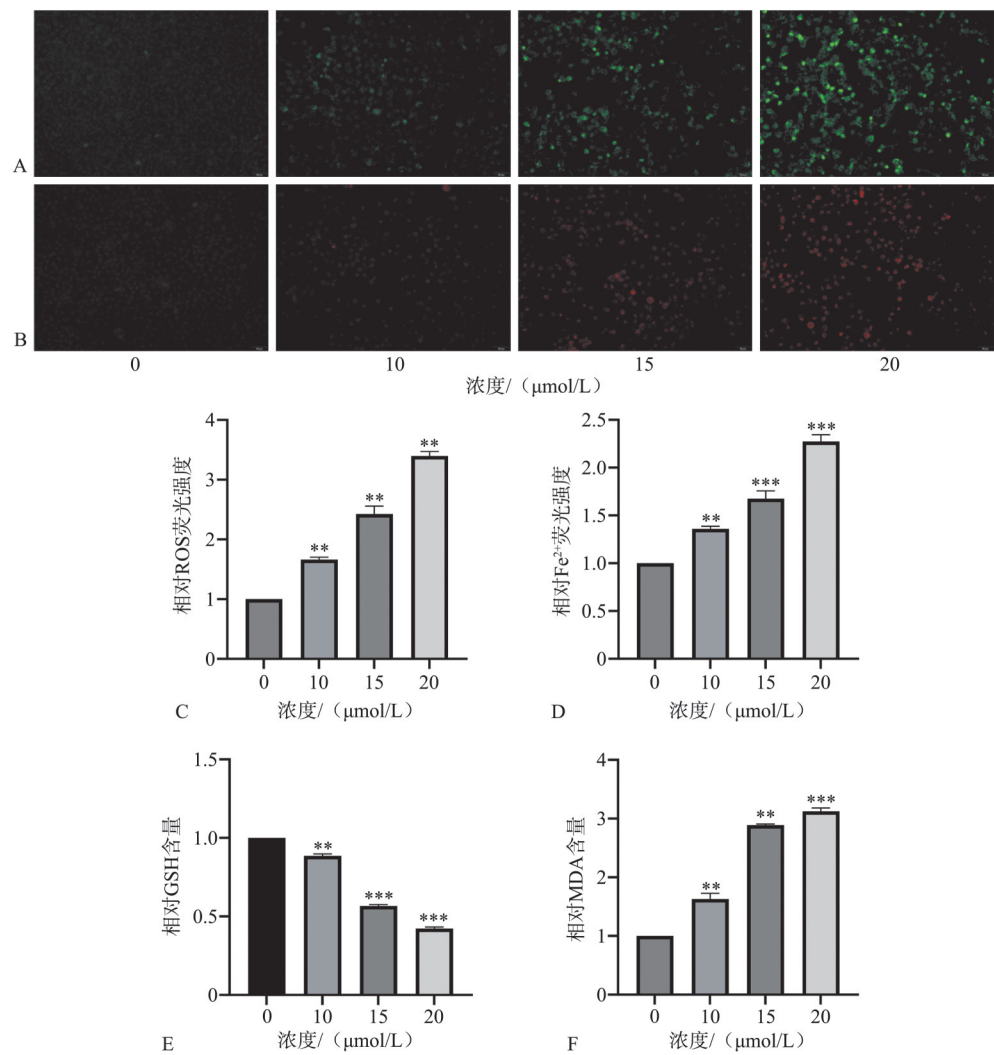
0.01) (图 4A~D), 表示细胞内 ROS、 Fe^{2+} 浓度明显增多, 相应的细胞内 GSH 含量明显降低 (图 4E), 且脂质过氧化产物 MDA 的积累明显增多 ($P<0.01$) (图 4F)。



A: 各组细胞平板克隆图; B: 各组细胞平板克隆统计图, 与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 不同浓度 CuB 对 CAL-27 细胞克隆能力的影响

Fig 3 Effects of different concentrations of CuB on the cloning ability of CAL-27 cells



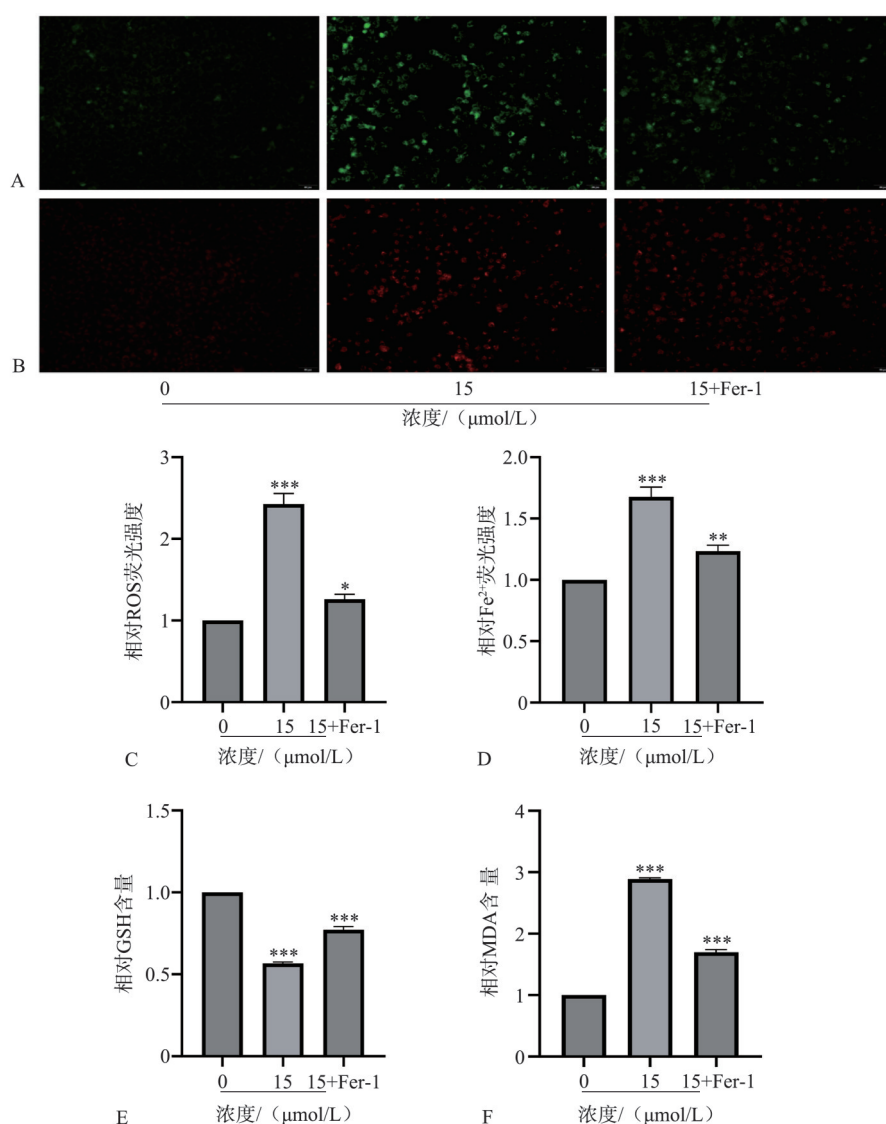
A: 各组细胞 ROS 荧光强度图 荧光显微镜 ×200; B: 各组细胞 Fe²⁺ 荧光强度图 荧光显微镜 ×200; C: 各组细胞 ROS 荧光强度统计图; D: 各组细胞 Fe²⁺ 荧光强度统计图; E: 各组细胞 GSH 含量统计图; F: 各组细胞 MDA 含量统计图; 与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 CuB 对 CAL-27 细胞铁死亡相关指标的影响

Fig 4 Effect of CuB on iron death related indexes of CAL-27 cells

2.5 Fer-1 联合 CuB 可逆转细胞内 ROS、Fe²⁺、GS-H、MDA 含量改变
CAL-27 细胞中 ROS、Fe²⁺ 荧光强度与对照组

相比显著降低 ($P<0.05$) (图 5A~D), 细胞内 GSH 及 MDA 含量被显著逆转 ($P<0.001$) (图 5E、F), 由此可见, CuB 诱导 CAL-27 细胞发生了铁死亡。



A: 各组细胞ROS荧光强度图 荧光显微镜 ×200; B: 各组细胞Fe²⁺荧光强度图 荧光显微镜 ×200; C: 各组细胞ROS荧光强度统计图; D: 各组细胞Fe²⁺荧光强度统计图; E: 各组细胞GSH含量统计图; F: 各组细胞MDA含量统计图; 与对照组相比, ***P*<0.01, ****P*<0.001。

图 5 Fer-1联合CuB对CAL-27细胞铁死亡相关指标的影响

Fig 5 Effects of Fer-1 combined with CuB on iron death related indexes of CAL-27 cells

2.6 CuB可抑制细胞内铁死亡相关蛋白的表达

与对照组相比, CuB (10、15、20 μmol/L) 剂量组细胞中Nrf2、SLC7A11、GPX4含量明显下降 (*P*<0.01)。

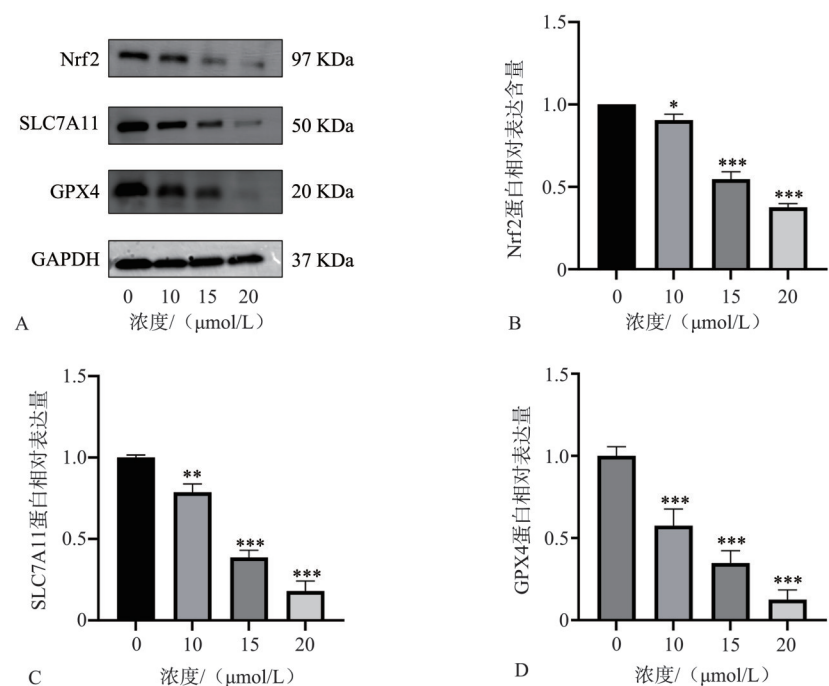
结果表明, CuB降低了铁死亡相关蛋白表达, 通过Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路诱导CAL-27细胞铁死亡(图6)。

2.7 Fer-1联合CuB可逆转细胞内铁死亡相关蛋白的表达

15 μmol/L CuB作用CAL-27细胞24 h后显著抑制了铁死亡相关蛋白Nrf2、SLC7A11、GPX4的表达, 加入Fer-1后与对照组相比相关蛋白表达量显著上升 (*P*<0.05)(图7)。

3 讨论

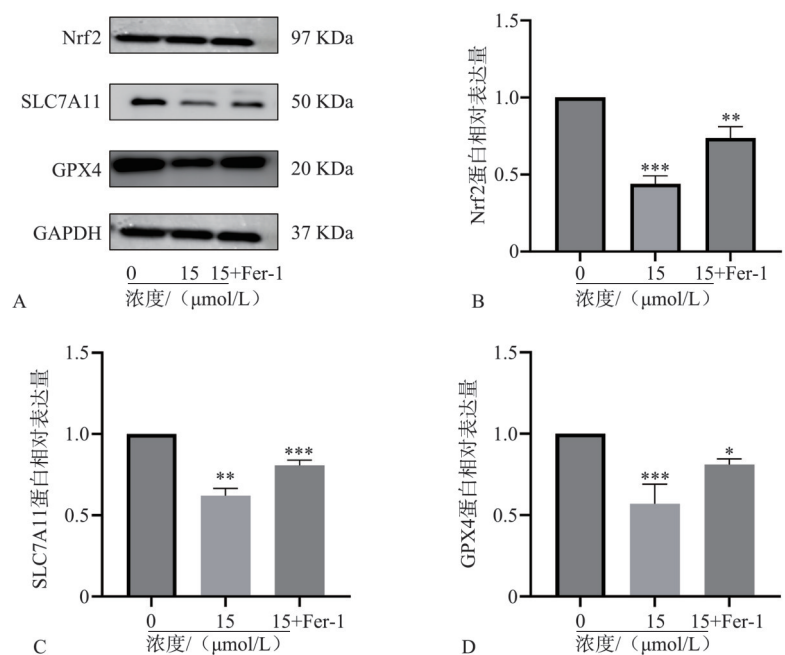
现代药理研究^[14-17]表明, CuB具有抗肿瘤、保肝、抗炎、提高机体免疫等多种生物活性, 其通过多种信号传导途径可抑制非小细胞癌、乳腺癌、结直肠癌以及前列腺癌等。目前已有研究^[18]表明, CuB能够抑制头颈部鳞状细胞癌的增殖, 但主要集中在细胞凋亡方面, 对于CuB是否能够诱导TSCC细胞发生铁死亡的报道尚未见。本研究旨在通过评估不同浓度CuB对TSCC细胞CAL-27的毒性效应及相关铁死亡标志物的变化, 初步揭示CuB通过诱导铁死亡途径对TSCC细胞的抑制作用。



A: 各组细胞中铁死亡相关分子蛋白表达图; B~D: 各组细胞中 Nrf2、SLC7A11、GPX4 的蛋白表达统计图; 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 6 CuB 对 CAL-27 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of CuB on expression of iron death related protein in CAL-27 cells



A: 各组细胞中铁死亡相关分子蛋白表达图; B~D: 各组细胞中 Nrf2、SLC7A11、GPX4 的蛋白表达统计图; 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 7 Fer-1 联合 CuB 对 CAL-27 细胞铁死亡相关蛋白表达的影响

Fig 7 The effect of Fer-1 combined with CuB on the expression of ferroptosis-related proteins in CAL-27 cells

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式, 其特点是由铁依赖的脂质过氧化物积累导致的细胞死亡, 与凋亡、坏死等传统细胞死亡方式存在显著差异,

铁代谢失衡与脂质过氧化现象的加剧, 构成了铁死亡的 2 个核心代谢特征^[19-21]。鉴于此, 那些涉及铁代谢与脂质代谢调控的基因, 能够通过直接或

间接的分子机制,影响细胞内铁负荷的调节脂质过氧化反应的进程,进而实现对铁死亡过程的精细调控^[22]。此外,GSH作为体内至关重要的非酶类抗氧化物质,其在防止脂质过氧化方面展现出了不可替代的作用。GSH作为GPX4的关键辅因子,能够催化并转化有毒的脂质过氧化物为无害的醇类物质,从而有效遏制脂质过氧化的连锁反应^[23],并且可利用谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)将氧化型谷胱甘肽(glutathione synthetase, GSSG)还原为GSH,保护细胞免受氧化应激的损害^[24]。铁死亡相关基因筛选共有3个候选基因选出,分别是Nrf2、SLC7A11、GPX4。有研究^[25-26]表明,Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白的失活被视为铁死亡发生的重要标志,故研究Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路显得尤为重要。Nrf2可诱导抗氧化系统的SLC7A11与GPX4表达,这些抗氧化蛋白能够清除脂质ROS,从而直接避免铁死亡,作为重要的抗氧化转录因子,Nrf2可通过激活一系列含有ARE基因序列的靶基因来降低ROS水平,维持细胞的ROS相对稳态,这些基因负责一部分调节GSH代谢^[27],另一部分负责酶促抗氧化系统,因此,Nrf2被普遍认为是细胞抗氧化反应的主要调节剂^[28]。SLC7A11作为一种关键的膜转运蛋白,扮演着半胱氨酸-谷氨酸反向转运体的角色,在细胞内外物质交换中发挥着不可或缺的作用^[29]。这一转运体主要负责将细胞外的半胱氨酸转运至细胞内,同时将细胞内的谷氨酸释放到细胞外,从而维持细胞内半胱氨酸的稳态,这对于多种细胞功能至关重要,特别是与氧化防御系统密切相关^[30-31]。GPX4存在SLC7A11的下游调控路径中,是谷胱甘肽过氧化物酶家族的一员,对于清除细胞内由氧化应激产生的过氧化氢及其他过氧化物至关重要,GPX4通过催化GSH与这些有害的过氧化物反应,生成无毒的产物从而保护细胞免受氧化损伤^[32]。因此,GPX4的活性直接关联到细胞的抗氧化能力和生存状态。当Nrf2和SLC7A11的表达受到抑制时,细胞内的半胱氨酸供应减少,进而影响GPX4的活性,导致细胞抗氧化能力下降,这种情况下,细胞内累积的ROS无法被有效清除,ROS水平显著升高,触发了铁死亡的机制^[33-35]。综上所述,Nrf2、SLC7A11、GPX4之间的复杂相互作用构成了细胞应对氧化应激和铁死亡的重要调控网络。理解这一网络的工作原理,不仅有助于揭示细胞死亡机制的多样性,

还可能为癌症治疗、神经退行性疾病等氧化应激相关疾病的治疗提供新的策略。

本研究通过应用不同浓度的CuB对CAL-27细胞进行处理,并采用CCK-8检测法,明确揭示了CuB对CAL-27细胞的抑制作用呈现出显著的剂量依赖特性,进一步观察发现,随着CuB浓度的升高,可诱导CAL-27细胞内Nrf2呈现下降趋势,并下调下游蛋白SLC7A11与GPX4蛋白的表达水平,且铁死亡抑制剂Fer-1可逆转其变化,这是细胞铁死亡途径中的关键分子变化。此外,本研究还深入探讨了CuB处理对CAL-27细胞内多种生化指标的影响。结果显示,随着CuB浓度的梯度增加,细胞内ROS、MDA及Fe²⁺的含量显著上升,而GSH的含量则逐渐降低,并且CuB作用于铁死亡相关指标可以被铁死亡抑制剂有效逆转。综上所述,CuB可以诱导TSCC/CAL-27细胞发生铁死亡,其机制可能是通过Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路来实现的。然而,本研究还存在一些局限性,只进行了TSCC细胞的体外细胞学研究,缺乏相关动物模型实验,后续研究可考虑增加小鼠皮下移植瘤模型、免疫组化以及增加细胞株等实验,进一步验证CuB诱导铁死亡的潜力,为TSCC的临床治疗开辟新的视角。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

- [1] Hu SM, Lu HZ, Xie WQ, et al. TDO2⁺ myofibroblasts mediate immune suppression in malignant transformation of squamous cell carcinoma[J]. J Clin Invest, 2022, 132(19): e157649.
- [2] Meng X, Lou QY, Yang WY, et al. The role of non-coding RNAs in drug resistance of oral squamous cell carcinoma and therapeutic potential[J]. Cancer Commun, 2021, 41(10): 981-1006.
- [3] Kalaimani G, Rao UDK, Joshua E, et al. E-cadherin expression in premalignant lesions, premalignant conditions, oral squamous cell carcinoma, and normal mucosa: an immunohistochemical study[J]. Cureus, 2023, 15(8): e44266.
- [4] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [5] Mou YH, Wang J, Wu JC, et al. Ferroptosis, a new

- form of cell death: opportunities and challenges in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [6] Zhang XD, Liu ZY, Wang MS, et al. Mechanisms and regulations of ferroptosis[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1269451.
- [7] Kim EH, Shin D, Lee J, et al. C1SD2 inhibition overcomes resistance to sulfasalazine-induced ferroptotic cell death in head and neck cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 432: 180-190.
- [8] Ma L, Chen C, Zhao C, et al. Targeting carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A) induces ferroptosis and synergizes with immunotherapy in lung cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 64.
- [9] 孙晟杰, 涂画, 唐励静, 等. 铁死亡诱导剂和抑制剂的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(8): 623-633.
- Sun SJ, Tu H, Tang LJ, et al. Research progress in inducers and inhibitors of ferroptosis[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2020, 34(8): 623-633.
- [10] Qian XJ, Lin S, Li J, et al. Fisetin ameliorates diabetic nephropathy-induced podocyte injury by modulating Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 9331546.
- [11] Dai S, Wang C, Zhao XT, et al. Cucurbitacin B: a review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106587.
- [12] 曾泽瑶, 苏佳婷, 罗连响. 葫芦素 B 通过靶向 STA-T3 促进铁死亡抑制非小细胞肺癌的生长[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(S1): 28.
- Zeng ZY, Su JT, Luo LX. Cucurbitacin B promotes ferroptosis by targeting STAT3 to inhibit the growth of non-small cell lung cancer[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2023, 37(S1): 28.
- [13] 蔡晓钧, 杨仁义, 王智槟, 等. 基于 p53/SLC7A11/GPX4 通路研究疏肝祛瘀解毒方诱导肝癌细胞铁死亡的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(8): 74-82.
- Cai XJ, Yang RY, Wang ZB, et al. Mechanism of inducing ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells by Shugan Quyu Jiedu prescription based on p53/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. *Chin J Experiment Trad Med Formul*, 2024, 30(8): 74-82.
- [14] Yuan R, Zhao WT, Wang QQ, et al. Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer *in vivo* and *in vitro* by triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105748.
- [15] Zhang HY, Zhao B, Wei HZ, 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.
- [16] Alafnan A, Khalifa NE, Hussain T, et al. Cucurbitacin-B instigates intrinsic apoptosis and modulates Notch signaling in androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1286507.
- [17] Chu XL, Zhang L, Zhou YJ, et al. Cucurbitacin B alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated inflammation and reducing oxidative stress[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2022: zbac065.
- [18] Huang S, Cao BH, Zhang JL, et al. Induction of ferroptosis in human nasopharyngeal cancer cells by cucurbitacin B: molecular mechanism and therapeutic potential[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 237.
- [19] Tang D, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications[J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [20] Liang D, Minikes AM, Jiang X. Ferroptosis at the intersection of lipid metabolism and cellular signaling[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2215-2227.
- [21] Zhang M, Lei Q, Huang XB, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and the potential therapeutic targets of ferroptosis signaling pathways for glioblastoma[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1071897.
- [22] Sun Y, Chen P, Zhai B, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110108.
- [23] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175-185.
- [24] Xu Y, Li YT, Li JX, et al. Ethyl carbamate triggers ferroptosis in liver through inhibiting GSH synthesis and suppressing Nrf2 activation[J]. *Redox Biol*, 2022, 53: 102349.
- [25] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4

- [J]. Cell, 2014, 156(1/2): 317-331.
- [26] Alim I, Caulfield JT, Chen YX, et al. Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke[J]. Cell, 2019, 177(5): 1262-1279.e25.
- [27] Koppula P, Zhuang L, Gan BY. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620.
- [28] Hong T, Lei G, Chen X, et al. PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer[J]. Redox Biol, 2021, 42: 101928.
- [29] Sykietis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease[J]. Sci Signal, 2010, 3(112): re3.
- [30] Xiang MJ, Namani A, Wu SJ, et al. Nrf2: bane or blessing in cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(8): 1251-1259.
- [31] Wang C, Liu HH, Xu S, et al. Ferroptosis and neurodegenerative diseases: insights into the regulatory roles of SLC7A11[J]. Cell Mol Neurobiol, 2023, 43(6): 2627-2642.
- [32] Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 144-152.
- [33] Miao Y, Chen YW, Xue F, et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression[J]. EBioMedicine, 2022, 76: 103847.
- [34] Zeng C, Lin J, Zhang KT, et al. SHARPIN promotes cell proliferation of cholangiocarcinoma and inhibits ferroptosis via p53/SLC7A11/GPX4 signaling [J]. Cancer Sci, 2022, 113(11): 3766-3775.
- [35] Guo C, Zhao W, Wang W, et al. Study on the antitumor mechanism of tanshinone II A *in vivo* and *in vitro* through the regulation of PERK-ATF4-HSPA5 pathway-mediated ferroptosis[J]. Molecules, 2024, 29(7): 1557.
- (本文编辑 张玉楠)

《口腔种植规范化治疗清单—— 种植遇到邻牙根尖周病多学科联合治疗》出版发行

书籍名称: 口腔种植规范化治疗清单——种植遇到邻牙根尖周病多学科联合治疗

主编: 满毅, 黄定明

出版社: 人民卫生出版社

内容简介: 本书重点介绍了种植—牙体牙髓联合治疗策略, 包括口腔种植的新技术和新进展, 以及牙体牙髓疾病显微根尖外科的相关内容和操作细节。通过大量病例展示不同临床场景下联合治疗的适用范围和治疗程序。书中附有500余幅高质量的临床图片, 并配有对应的操作视频及三维动画, 多层次、多维度地帮助读者学习和理解。本书为口腔种植学与牙体牙髓病学的交叉融合提供了新模式, 为提高天然牙的保存、种植体的存留提供了有效的手段, 为临床医师面临种植位点遇到邻牙根尖周病的临床难题时制订治疗方案提供了全新思路。

