◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Jul; 31(7): 865-874

银杏素通过 GPX4/OTUB1 轴诱导铁死亡抑制三阴性乳腺癌细胞增殖与迁移

杨　锋[1]，史　伟[1]，王慧玲[2]，郑自通[3]

[1]湖南省人民医院（湖南师范大学第一附属医院）药学部，长沙 410006，湖南；
[2]湖南省人民医院（湖南师范大学第一附属医院）乳甲二科，长沙 410006，湖南；
[3]南华大学附属第二医院药学部，衡阳 421000，湖南

摘要　**目的**：观察银杏素对三阴性乳腺癌（TNBC）细胞铁死亡的影响，并探讨其通过调控 GPX4/OTUB1 轴发挥抗肿瘤作用的机制。**方法**：将 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞分为溶媒对照组（0.1% DMSO）、银杏素组（5、10、20 μmol/L）和联合干预组（20 μmol/L 银杏素+10 μmol/L Fer-1 或 20 μmol/L DFP）。采用 CCK-8 法检测细胞活力；EdU 染色观察细胞增殖；集落形成实验评估细胞增殖能力；Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭；流式细胞术检测细胞内活性氧（ROS）、脂质过氧化和 Fe^{2+}水平；透射电镜（TEM）观察线粒体形态；Western blot 检测 GPX4、OTUB1 等蛋白表达；免疫共沉淀分析 GPX4 与 OTUB1 的相互作用；免疫荧光观察 GPX4 和 OTUB1 的共定位。**结果**：CCK-8、EdU 染色实验、集落形成实验和 Transwell 实验表明，银杏素处理可引起 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的增殖侵袭迁移能力显著降低，且呈剂量依赖性。铁死亡相关指标检测显示，银杏素处理组细胞内 ROS 水平、脂质过氧化产物和 Fe^{2+}含量显著升高（P<0.01），GSH 水平显著降低（P<0.01），而铁死亡抑制剂 Fer-1 和 DFP 可部分逆转这些效应。铁死亡抑制剂对侵袭迁移的恢复效果也得到了证实。TEM 观察到银杏素诱导的典型铁死亡线粒体形态改变。Western blot 显示银杏素显著下调 GPX4 蛋白表达（P<0.01），促进其泛素化降解。免疫共沉淀证实银杏素抑制 OTUB1 与 GPX4 的相互作用（P<0.01）。**结论**：银杏素可通过抑制 OTUB1 与 GPX4 的相互作用，促进 GPX4 泛素化降解，进而诱导铁死亡，发挥抗 TNBC 作用。

关键词　银杏素；三阴性乳腺癌；铁死亡；谷胱甘肽过氧化物酶 4；去泛素化酶 OTUB1

中图分类号：R737.9；R965.2
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)07-0865-10
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.07.001

近年来，三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer，TNBC）因其独特的生物学特性及临床治疗挑战备受关注。流行病学数据显示，TNBC 约占乳腺癌总数的 15%～20%，相较于其他亚型，其治疗选择有限且预后较差[1]。现有临床手段中，内分泌治疗和靶向治疗对 TNBC 响应率低，化疗仍是主要治疗方式，但存在毒性累积和耐药复发风险高等显著缺陷[2]。值得警惕的是，TNBC 患者五年生存率较其他乳腺癌亚型显著降低，且更易出现早期转移[3]，迫切需要开发新型治疗策略。

铁死亡（ferroptosis）作为程序性细胞死亡的新范式，为肿瘤治疗提供了创新视角。其机制核心在于铁离子依赖性脂质过氧化物的异常蓄积，以及谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）功能的特异性抑制[4]。值得注意的是，TNBC 细胞因独特的代谢重塑及氧化应激失衡特征，展现出对铁死亡诱导的高度敏感性[5]。

2025-09-01 收稿　2025-12-19 修回
湖南省自然科学基金（2021JJ80015，2026JJ81320）
杨锋，男，研究方向：炎症通路与分子肿瘤药理学研究。
E-mail: yangyayue201612@163.com
郑自通，通信作者，男，研究方向：肿瘤药理学研究。
E-mail: usczzt@163.com
王慧玲，通信作者，女，主任医师，研究方向：乳腺甲状腺疾病微创与规范化诊疗。
E-mail: jonnce.1018@163.com

GPX4 作为关键的氧化还原稳态调节蛋白，通过清除脂质过氧化物维持细胞存活。当 GPX4 活性被抑制时，未被中和的脂质过氧化物可诱发不可逆的膜结构损伤，最终触发铁死亡[6]。这一机制提示，靶向 GPX4 的铁死亡调控网络可能成为 TNBC 治疗的潜在突破口。

银杏素（Ginkgetin）是源自银杏叶的双黄酮类天然产物，已证实具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多重生物学效应[7]。近年研究逐步揭示其通过调控细胞周期、诱导凋亡等途径抑制肿瘤进展，但其对 TNBC 的作用机制仍存在研究空白。本团队前期工作发现，银杏素可显著抑制 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 的增殖与迁移，且该效应与细胞内氧化应激水平动态变化密切相关。鉴于铁死亡通路在 TNBC 治疗中的战略价值，以及银杏素调节氧化还原平衡的潜在能力，我们提出科学假设：银杏素可能通过干预 GPX4 介导的铁死亡级联反应发挥抗 TNBC 效应。本研究综合运用细胞生物学与分子生物学技术，系统解析银杏素诱导 TNBC 细胞铁死亡的分子机制，为阐明银杏素抗肿瘤作用提供新视角及基于铁死亡调控的 TNBC 靶向治疗策略开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 银杏素（HPLC 纯度≥98%，货号：G20231101，上海源叶生物）；MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞（货号：HTB-26 和 HTB-132，美国 ATCC）；CCK-8 试剂盒（货号：CK04）与 FerroOrange 荧光探针（货号：F374）购自日本 Dojindo；EdU 细胞增殖检测试剂盒（货号：C10310-1）、DCFH-DA 荧光探针（货号：S0033S）、DAPI 染液（货号：C1002）和 GSH 检测试剂盒（货号：S0053）购自上海碧云天生物公司；蛋白酶体抑制剂 MG-132（货号：S2619）、自噬抑制剂氯喹（CQ，货号：S4430）和 Fer-1（铁死亡抑制剂，货号：S7243）购自美国 Selleck；DFP（铁死亡抑制剂，货号：D579303，上海麦克林生化公司）；C11-BODIPY 荧光探针（货号：D3861，美国 Thermo Fisher）；鼠抗 GPX4 抗体（货号：ab125066）和兔抗 OTUB1 抗体（货号：ab109624）购自美国 Abcam；HRP-羊抗兔 IgG 二抗（货号：SA00001-2，美国 Proteintech）；Alexa Fluor 488 标记二抗（货号：A-11008）和 Alexa Fluor 594 标记二抗（货号：A-11012）购自美国 Invitrogen。主要仪器包括：激光共聚焦显微镜（型号 FV1200，日本 Olympus），全自动倒置荧光显微镜（型号 Thunder，德国 Leica），透射电镜（型号 Tecnai G2 Spirit Bio，美国 FEI），流式细胞仪（型号 AccuriC6 plus，美国 BD），化学发光成像系统（型号 Auto Chemi，美国 UVP），超薄切片机（型号 EM UC7，德国 Leica），酶标仪（型号 Multiskan GO，美国 Thermo Fisher）。

1.2 细胞培养与处理 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中，37 ℃、5% CO_2 条件下培养。实验分为以下处理组：溶媒对照组（Vehicle）：0.1% DMSO 处理 48 h；银杏素组（Ginkgetin）：5、10、20 μmol/L 银杏素处理 48 h；铁死亡抑制剂组（Ginkgetin + Fer-1/DFP）：20 μmol/L 银杏素联合 10 μmol/L Fer-1 或 20 μmol/L DFP 处理 48 h。

1.3 细胞活力检测（CCK-8 法） 将 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞以 8×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中，培养过夜后，按照上述分组的方法处理 48 h。处理结束后，显微镜下观察细胞形态并拍照，然后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，继续培养 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度（OD）值。

1.4 EdU 增殖检测 按 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书操作，将处理后的细胞与 EdU 孵育 2 h，4% 多聚甲醛固定，Hoechst 33342 染核，Leica Thunder 全自动倒置荧光显微镜拍摄图像，Image J 统计 EdU 阳性细胞比例（每组实验重复 3 次，每次任选 3 个视野）。

1.5 克隆形成实验 取对数生长期的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞，以 500 个/孔的密度接种于 6 孔板中（每组 3 复孔）。48 h 后更换含不同浓度银杏素的新鲜培养基，每 3 天换液 1 次。培养 10 d 后，4% 多聚甲醛固定细胞，0.1% 结晶紫染色，Image J 软件统计细胞的克隆数。

1.6 迁移和侵袭实验 Transwell 小室检测细胞迁移的方法：在无血清培养基重悬细胞（1×10^5/孔）接种于上室（8 μm 孔径），下室加含 10% 血清的培养基，48 h 后结晶紫染色，显微镜计数迁移细胞。检测细胞侵袭的方法，除了用基质胶包被的滤膜外，其他步骤同细胞迁移的检测方法。

1.7　活性氧(ROS)、脂质过氧化及 Fe^{2+}检测　流式细胞术检测细胞内 ROS、脂质过氧化和 Fe^{2+}水平。简要流程：处理的细胞洗涤后，分别按照试剂盒方法，用 10 μmol/L DCFH-DA 检测 ROS、C11-BODIPY 检测脂质过氧化、1 μmol/L FerroOrange 检测 Fe^{2+}，37 ℃ 避光孵育 30 min，AccuriC6 plus 流式细胞仪分析，FlowJo 10.7.1 软件处理数据。

1.8　透射电镜观察　细胞经处理后，收集细胞并固定，按电镜切片标准流程制备超薄切片，透射电镜下观察线粒体形态变化。

1.9　GSH 检测　GSH 按试剂盒说明书分别检测细胞内 GSH 含量(比色法)(酶标仪 412 nm 测定)。

1.10　Western blot　细胞裂解提取总蛋白，BCA 法定量后，40 μg 蛋白经 SDS-PAGE 电泳转至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶封闭 2 h，一抗 GPX4(1:2 000)和 GAPDH(1:9 000)4 ℃ 孵育过夜，洗涤后，HRP 标记二抗室温孵育 90 min，ECL 显影，凝胶成像系统采集图像，Image Lab 软件分析。

1.11　免疫共沉淀(Co-IP)　为验证 GPX4 与 OTUB1 的直接相互作用，实验中使用带有 Flag 标签的 GPX4 过表达质粒与带有 HA 标签的 OTUB1 过表达质粒共转染细胞，处理后的细胞裂解后，取上清与 1 μL 抗体及 10 μL Protein A/G 磁珠(Bioss，中国)4 ℃ 孵育过夜。洗涤后，1×上样缓冲体煮沸洗脱，SDS-PAGE 分离目标蛋白。然后用 Western blot 法检测蛋白表达。

1.12　免疫荧光实验　细胞用 4% 多聚甲醛固定后，用 0.1% Triton X-100 透化处理 10 min。之后用 5% 牛血清白蛋白进行封闭处理。将细胞与抗 GPX4 与抗 OTUB1 抗体在 4 ℃ 孵育过夜，PBS 洗涤 3 次后，加入对应荧光二抗避光孵育 1 h，再次用 PBS 洗涤 3 次。最后用 DAPI 染液染核 15 min。染色后的细胞使用共聚焦显微镜进行成像观察。

1.13　统计学处理　将 0 μmol/L 处理组的数值标准化为 100%，所有实验至少重复 3 次，数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析(ANOVA)，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　银杏素抑制 TNBC 细胞增殖　为探究银杏素对 TNBC 细胞系细胞增殖的影响，采用不同浓度银杏素(0、5、10、20 μmol/L)处理 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞，48 h 后观察细胞。光学显微镜下可见，随着银杏素浓度升高，MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞形态发生破坏且细胞稀疏(Fig.1A)。与之一致，CCK-8 实验显示，银杏素能显著抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的活力，其抑制能力具有浓度依赖性(Fig.1B)。EdU 增殖实验进一步证实银杏素以剂量依赖性抑制 TNBC 细胞增殖(Fig.1C-D)。

2.2　银杏素抑制 TNBC 细胞集落形成、迁移和侵袭　克隆形成实验进一步证实，银杏素处理显著降低了两种 TNBC 细胞的集落形成能力(Fig.2A-B)。Transwell 迁移侵袭实验结果显示(Fig.2C-F)，银杏素以剂量依赖性抑制 TNBC 细胞的侵袭和迁移能力。

2.3　银杏素通过铁死亡途径抑制 TNBC 细胞　我们进一步检测了铁死亡在银杏素引起 TNBC 细胞抑制中的作用。实验结果(Fig.3A-D)显示，当 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞经银杏素(20 μmol/L)单独处理或与铁死亡抑制剂 Fer-1(10 μmol/L)/DFP(20 μmol/L)联合处理 48 h 后，通过荧光探针 C11-BODIPY(脂质过氧化)、DCFH-DA(ROS)和 FerroOrange(Fe^{2+})以及 GSH 的 ELISA 检测发现，银杏素处理显著提高了细胞内脂质过氧化水平、ROS 及 Fe^{2+}含量并显著降低了细胞内 GSH 含量(均 $P<0.001$)，而 Fer-1 或 DFP 处理可逆转这些效应(均 $P<0.001$)。透射电镜观察发现，经银杏素的 MDA-MB-231 细胞表现出典型的铁死亡相关线粒体形态学改变：线粒体皱缩、膜密度增高、嵴减少或消失，而 Fer-1 或 DFP 处理可逆转这些形态学改变(Fig.3E)。为进一步验证铁死亡在其中的作用，我们通过 Transwell 实验证实，银杏素虽然显著降低了 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的迁移和侵袭数量，当加入铁死亡抑制剂 Fer-1 或 DFP 后的细胞的迁移和侵袭能力出现明显恢复(均 $P<0.001$，Fig.3F-I)。

2.4　银杏素促进 GPX4 的泛素化降解　为阐明银杏素调控铁死亡的机制，我们首先检测了对调控铁死亡至关重要的 GPX4 蛋白水平。我们首先采用蛋白质合成抑制剂 CHX 处理 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞。Western blot 结果显示，与溶媒对照组相比，银杏素处理组中 GPX4 蛋白的降

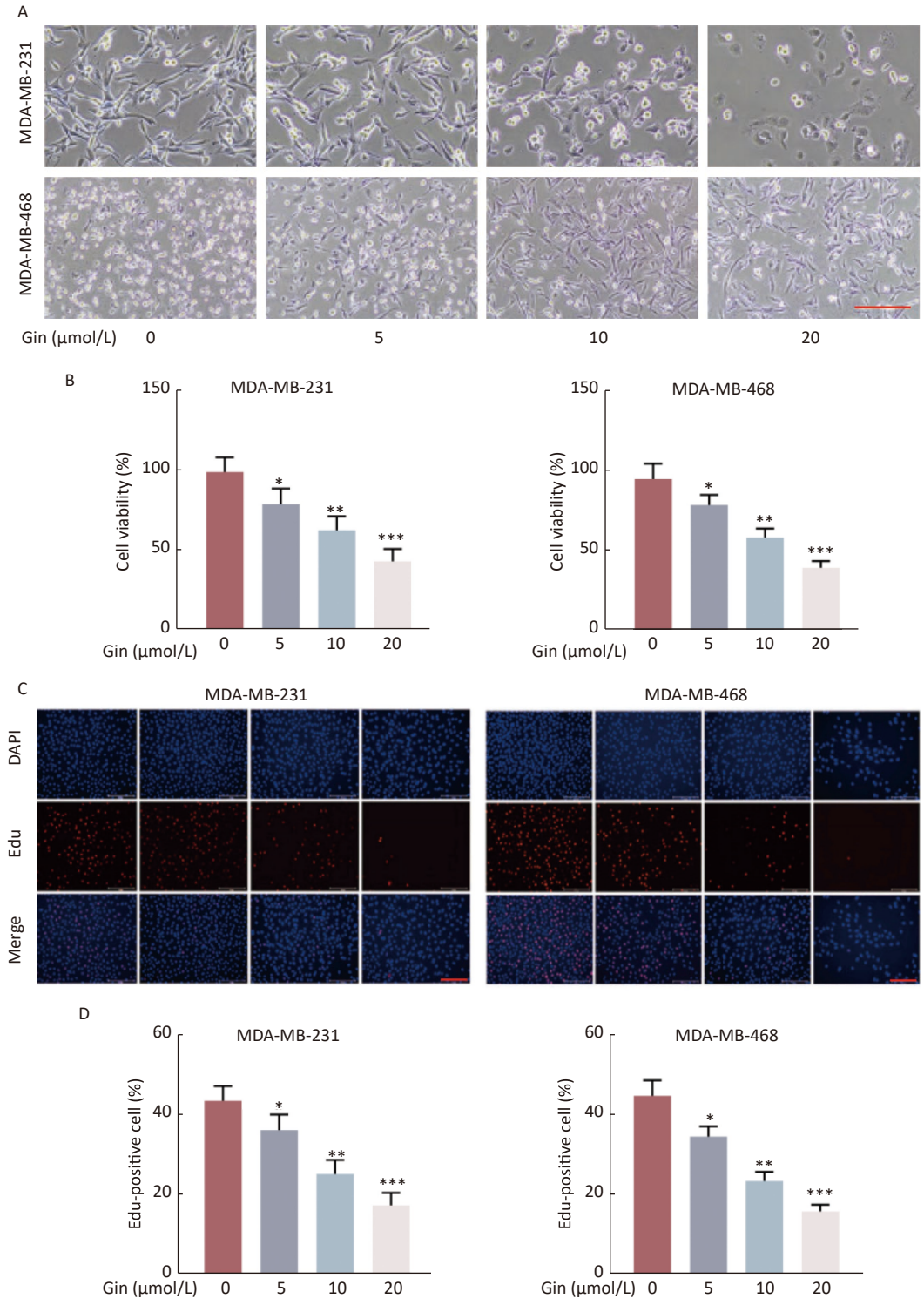


Fig.1 Inhibitory effect of ginkgetin on the proliferation of TNBC cell lines ($\bar{x}\pm s$, n=4)

A: representative morphological changes of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells after treatment with different concentrations of ginkgetin, scale bar=50 μm. B: cell viability of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells treated with different concentrations of ginkgetin measured by CCK-8. C: EdU staining was used to observe the effect of ginkgetin on cell proliferation, scale bar=100 μm. D: statistical analysis of the effect of ginkgetin on EdU staining. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 *vs.* 0 μmol/L group.

解速率显著加快(P<0.001, Fig.4A), 但给予铁死亡抑制剂后蛋白含量显著留存(P<0.001, Fig.4A), 提示银杏素可能通过调节铁死亡促进 GPX4 的降解。通过使用蛋白酶体抑制剂 MG132 和自噬抑

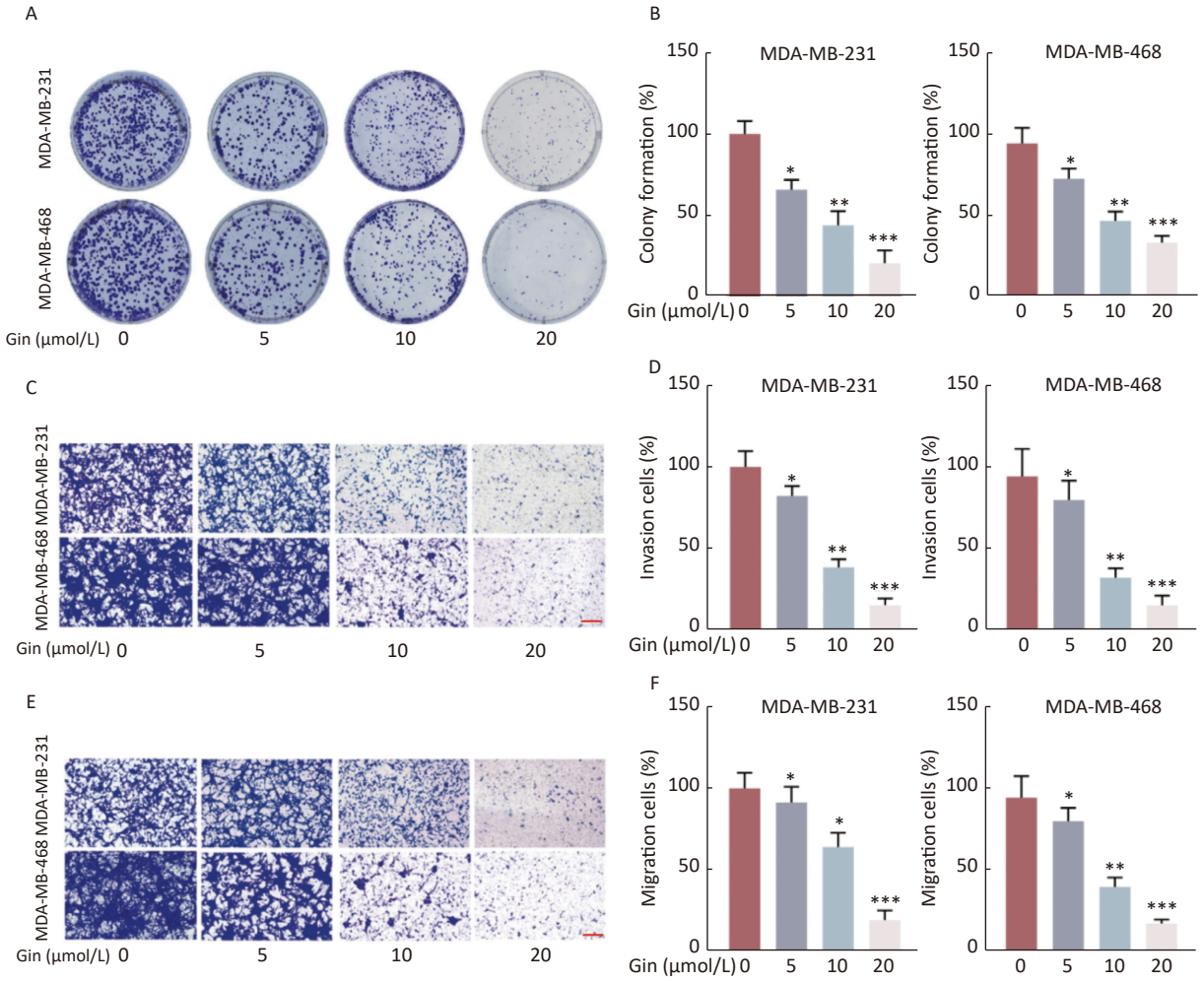


Fig.2　Ginkgetin inhibits colony formation, migration, and invasion in TNBC cells ($\bar{x}\pm s$, n=4)

A and B: colony formation assays and quantitative analysis of colony numbers in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. C-F: transwell migration and invasion assays with quantitative analysis of migration and invasion numbers. Scale bar=100 μm. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 *vs.* 0 μmol/L group.

制剂氯喹进行干预，发现 MG132 能显著阻断 GPX4 的降解（P<0.001，Fig.4B），而氯喹则无明显影响（P>0.05，Fig.4C），表明银杏素主要通过泛素-蛋白酶体途径促进 GPX4 降解，证实了银杏素通过促进 GPX4 泛素化降解的分子机制。

2.5　银杏素抑制 OTUB1 与 GPX4 的相互作用

我们关注了去泛素化酶 OTUB1 在其中的潜在作用。免疫荧光和免疫共沉淀实验证实，在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中 OTUB1 与 GPX4 存在共定位现象；银杏素处理显著减弱了 OTUB1 与 GPX4 的结合（P<0.001），这可能是其促进 GPX4 泛素化降解的关键机制，见 Fig.5。

3　讨论

本研究系统探究了银杏素在 TNBC 细胞中通过调控铁死亡途径抗肿瘤的作用机制。实验结果表明，银杏素能够显著抑制 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，且这种抑制作用呈剂量依赖性。更重要的是，我们发现银杏素通过干扰 OTUB1 与 GPX4 的相互作用，促进 GPX4 的泛素化降解，进而诱导铁死亡，为开发新型抗 TNBC 药物提供了潜在靶点。

首先，本研究证实银杏素对 TNBC 细胞具有显著的抗增殖作用。CCK-8、EdU 和集落形成实验显示，银杏素处理可显著降低细胞活力和增殖能力，且这种抑制作用随着药物浓度的增加而增强。这与先前关于银杏素抗肿瘤作用的研究结果一致[8]。值得注意的是，Transwell 实验进一步表明，银杏素还能显著减弱其迁移和侵袭能力。这一发现具有重要意义，因为 TNBC 的高转移性是

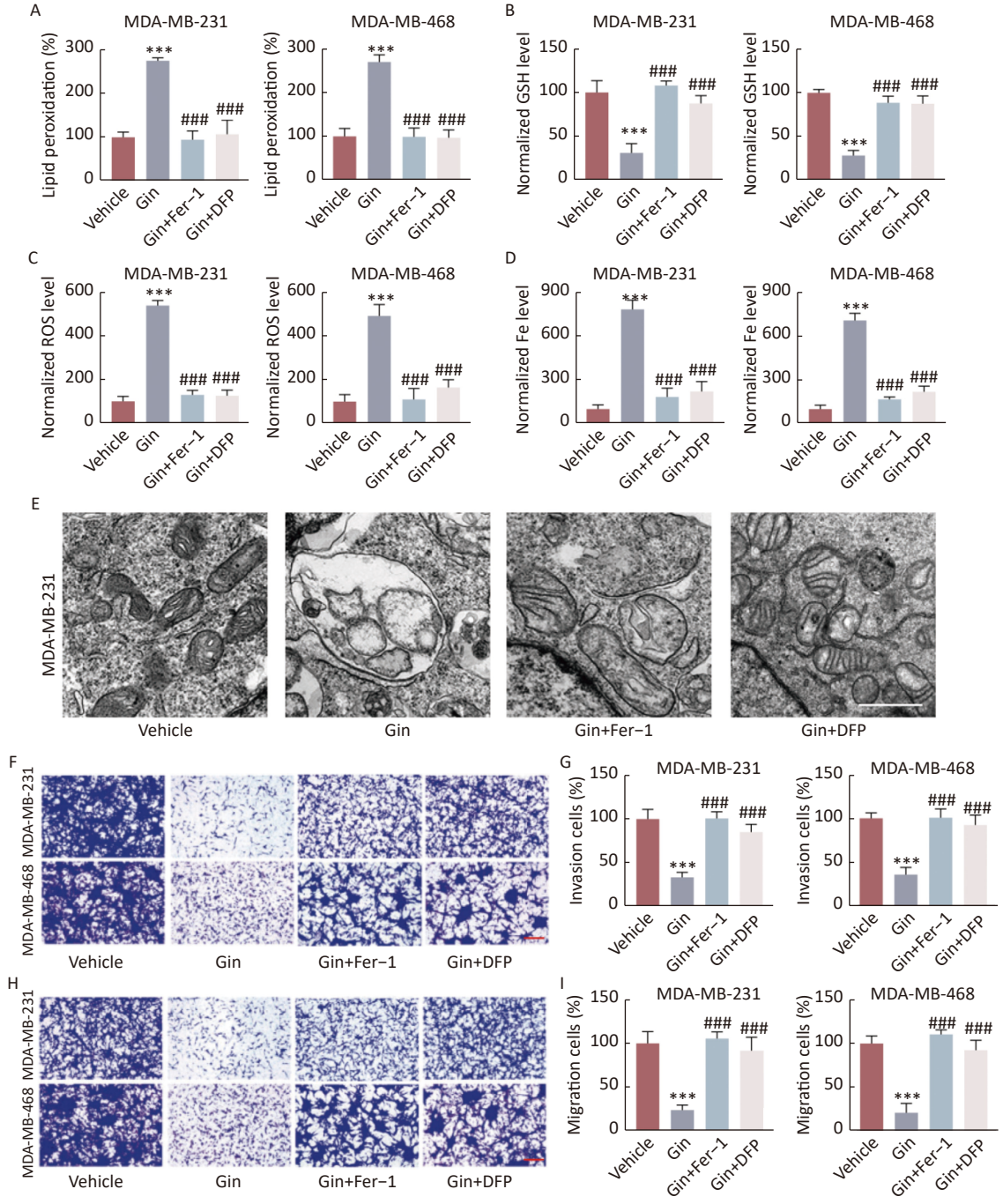


Fig.3 Ginkgetin suppresses TNBC cells through the ferroptosis pathway ($\bar{x}\pm s$, n=4)

A: lipid peroxidation level. B: intracellular GSH level. C: intracellular ROS level. D: intracellular Fe^{2+} content. E: transmission electron microscopy (TEM) images showing mitochondrial morphology (scale bar = 1 μm). F-I: transwell migration and invasion assays with statistical analysis, scale bar=100 μm. ***P < 0.001 *vs.* Vehicle group; ###P < 0.001 *vs.* Gin group.

导致患者预后不良的主要原因之一[9]。因此，银杏素可能通过抑制 TNBC 细胞的转移潜能，为改善患者预后提供新的治疗策略。

其次，本研究揭示了银杏素诱导铁死亡的关键机制。铁死亡作为一种新型的程序性细胞死亡方式，在肿瘤治疗中展现出独特优势[10]。我们的研究发现，银杏素处理显著增加了细胞内 ROS 水平、脂质过氧化产物和 Fe^{2+}含量，同时降低了 GSH 水平，这些变化是铁死亡的典型特征[11]。更重要的是，铁死亡抑制剂 Fer-1 和 DFP 能够部分逆转银杏素的抗肿瘤效应，进一步证实了铁死亡在银杏素抗 TNBC 作用中的关键地位。透射电镜

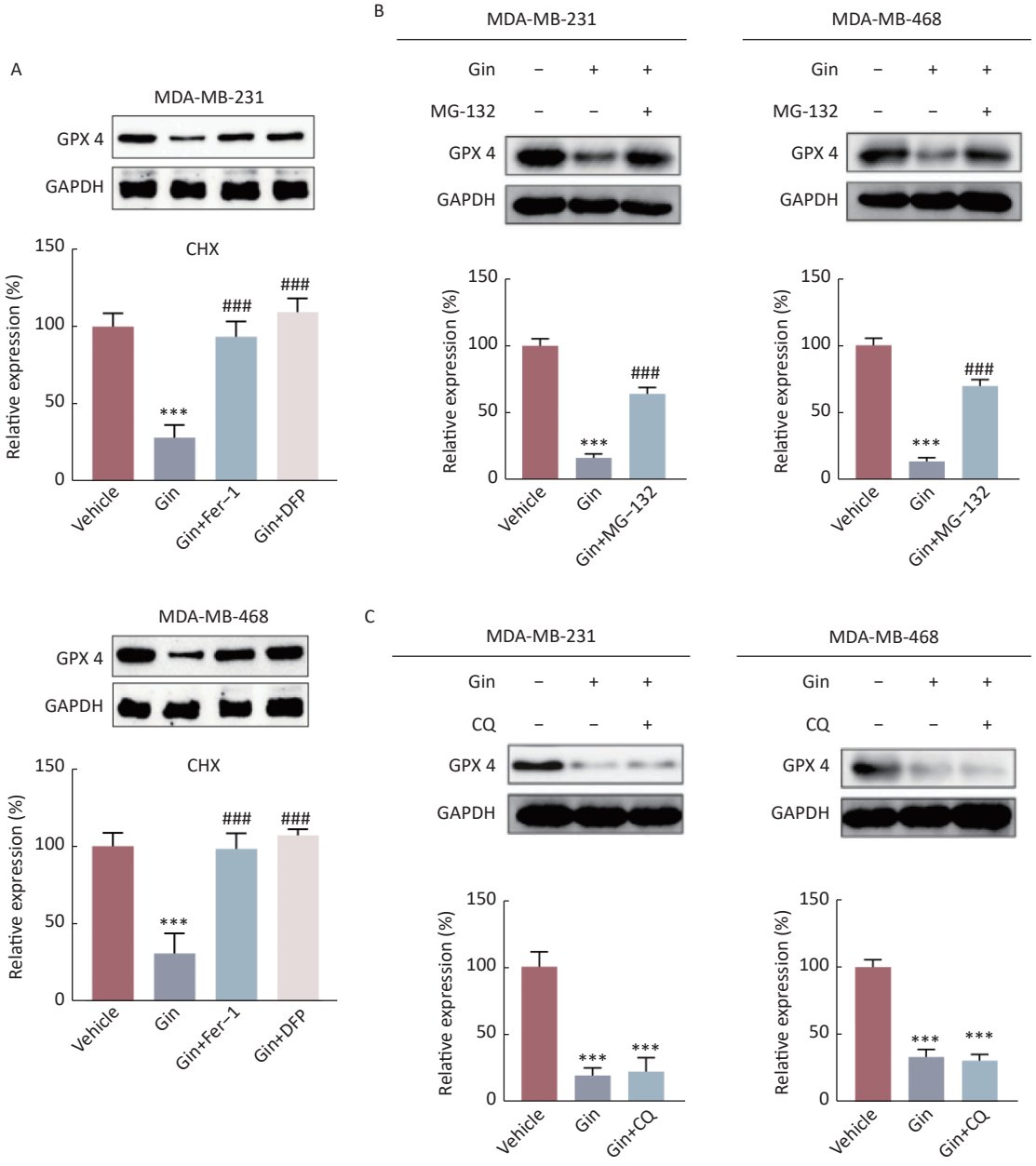


Fig.4　Ginkgetin promotes ubiquitination and degradation of GPX4 in TNBC cells ($\bar{x}\pm s$, n=4)

A: Western blot analysis of GPX4 protein levels in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells after treatment with ginkgetin and ferroptosis inhibitors. B and C: Western blot analysis of GPX4 protein levels in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells treated with 20 μmol/L ginkgetin and co-treated with the proteasome inhibitor MG-132 (10 μmol/L) (B) or the autophagy inhibitor chloroquine (CQ, 20 μmol/L) (C). ***P < 0.001 *vs.* Vehicle group; ###P < 0.001 *vs.* Gin group.

观察到的线粒体形态学改变也为银杏素诱导铁死亡提供了直接的形态学证据。这些结果与近年来越来越多的研究报道一致，即铁死亡诱导可能成为 TNBC 治疗的新策略[12-13]。

在分子机制方面，本研究首次揭示了银杏素通过调控 GPX4/OTUB1 轴诱导铁死亡的详细机制。GPX4 是铁死亡的关键调控蛋白，通过还原脂质过氧化物维持细胞氧化还原平衡[14]。我们的 Western blot 结果显示，银杏素显著下调 GPX4 蛋白表达，而蛋白酶体抑制剂 MG132 能够阻断这一作用，表明银杏素主要通过泛素-蛋白酶体途径促进 GPX4 降解。这一发现与 Dixon 等[15]提出的 GPX4 在铁死亡中的核心作用相吻合。更值得注意的是，我们通过免疫共沉淀和免疫荧光实验共同证实，银杏素能够干扰 OTUB1 与 GPX4 的相互作用。OTUB1 作为一种去泛素化酶，在维持 GPX4

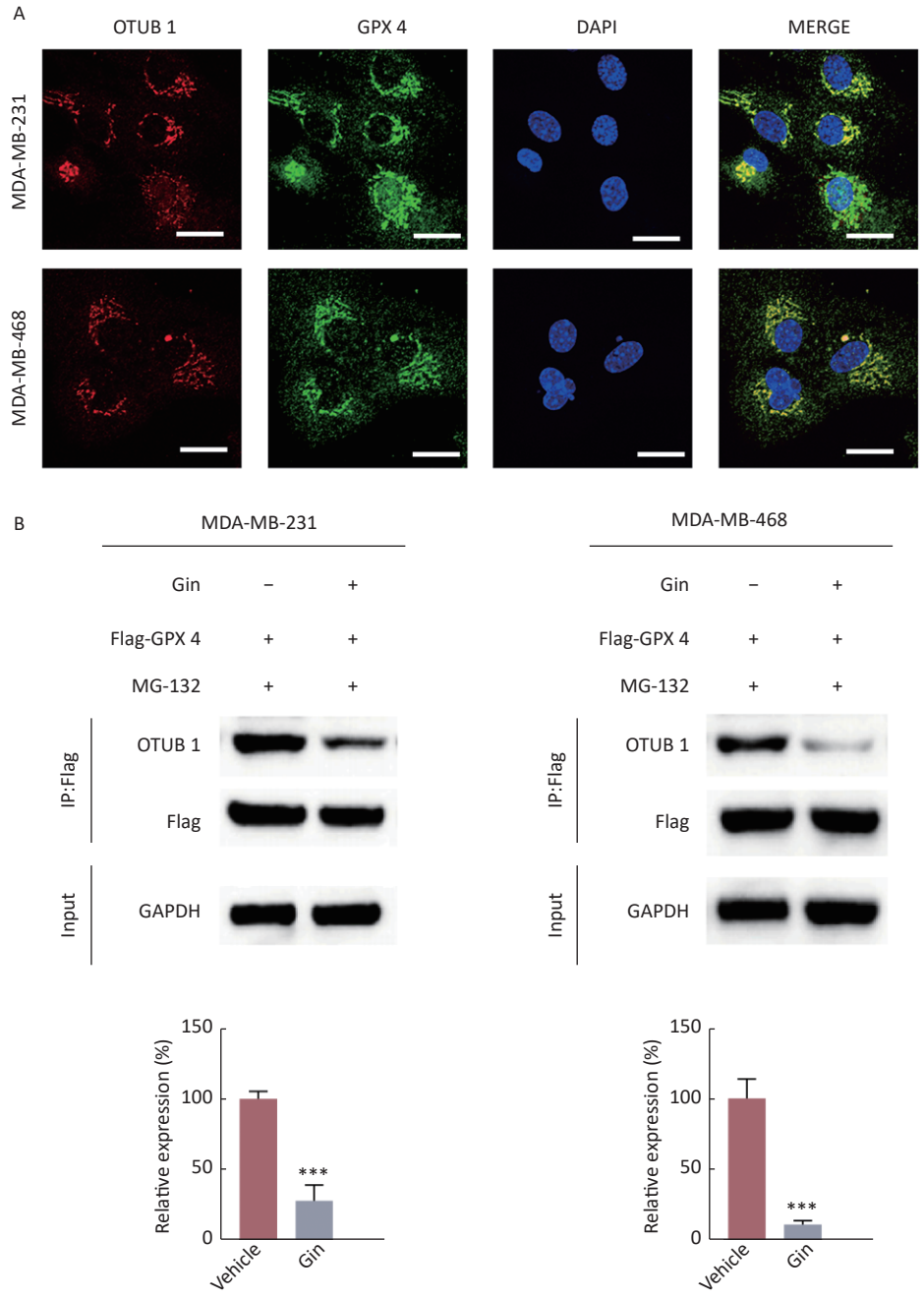


Fig.5 Ginkgetin inhibits the interaction between OTUB1 and GPX4 in TNBC cells ($\bar{x}\pm s$, n=4)

A: immunofluorescence analysis of the co-localization of OTUB1 (red) and GPX4 (green) in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. Nuclei are shown by DAPI staining (blue). Scale bar=10 μm. B: Co-immunoprecipitation (Co-IP) assay detects the interaction between GPX4 and OTUB1 in different treatment groups. ***P < 0.001 *vs.* Vehicle group.

蛋白稳定性中发挥重要作用[16]。银杏素通过抑制 OTUB1 与 GPX4 的结合，可能削弱了 OTUB1 对 GPX4 的去泛素化作用，从而促进 GPX4 的泛素化降解。这一发现为理解银杏素抗 TNBC 的分子机制提供了新的视角。

从临床转化角度来看，本研究具有重要的潜在应用价值。TNBC 由于缺乏有效的治疗靶点，临床治疗选择有限[17]。银杏素作为一种天然化合物，具有毒性低、来源广泛等优势。本研究为开发基于银杏素的抗 TNBC 药物提供了理论基础。特别是针对 GPX4/OTUB1 轴的调控策略，可能为克服 TNBC 治疗耐药性提供新的思路。未来研究可以进一步优化银杏素的给药方案，探索其与其他抗肿瘤药物的联合治疗效果。然而，本研究仍

存在一些局限性：首先，目前的研究仅局限于体外细胞实验，未来需要通过动物模型进一步验证银杏素的体内抗肿瘤效果；其次，银杏素对 OTUB1 活性的直接影响机制尚需更深入的探讨；最后，银杏素的药物代谢特性和潜在的毒副作用也需要进一步评估。

综上所述，本研究证实银杏素可通过抑制 OTUB1 与 GPX4 的相互作用，促进 GPX4 泛素化降解，进而诱导铁死亡，发挥抗 TNBC 作用。这些发现不仅丰富了银杏素的抗肿瘤机制研究，也为开发新型抗 TNBC 药物提供了潜在靶点和理论依据。未来的研究应着重于银杏素在体内的抗肿瘤效果评估及其临床转化应用。

参考文献

[1] Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of triple-negative breast cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2022, 17: 181-204.

[2] Leon-Ferre RA, Goetz MP. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer [J]. BMJ, 2023, 381: e071674.

[3] Li Y, Zhang H, Merkher Y, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 121.

[4] Liu Y, Wan Y, Jiang Y, et al. GPX4: the hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(3): 188890.

[5] Karim AM, Eun Kwon J, Ali T, et al. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 212: 115545.

[6] Zhang W, Liu Y, Liao Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116512.

[7] Adnan M, Rasul A, Hussain G, et al. Ginkgetin: a natural biflavone with versatile pharmacological activities [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 145: 111642.

[8] Liu Q, Chen L, Yin W, et al. Anti-tumor effect of ginkgetin on human hepatocellular carcinoma cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting cell apoptosis [J]. Cell Cycle, 2022, 21(1): 74-85.

[9] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1): 61.

[10] Yang F, Xiao Y, Ding JH, et al. Ferroptosis heterogeneity in triple-negative breast cancer reveals an innovative immunotherapy combination strategy [J]. Cell Metab, 2023, 35(1): 84-100. e8.

[11] Lorito N, Subbiani A, Smiriglia A, et al. FADS1/2 control lipid metabolism and ferroptosis susceptibility in triple-negative breast cancer [J]. EMBO Mol Med, 2024, 16(7): 1533-1559.

[12] Lei M, Zhang YL, Huang FY, et al. Gankyrin inhibits ferroptosis through the p53/SLC7A11/GPX4 axis in triple-negative breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 21916.

[13] Ding Y, Chen X, Liu C, et al. Identification of a small molecule as inducer of ferroptosis and apoptosis through ubiquitination of GPX4 in triple negative breast cancer cells [J]. J Hematol Oncol, 2021, 14(1): 19.

[14] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4 [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 175-185.

[15] Dixon SJ, Pratt DA. Ferroptosis: a flexible constellation of related biochemical mechanisms [J]. Mol Cell, 2023, 83(7): 1030-1042.

[16] Li D, Wang Y, Dong C, et al. CST1 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer metastasis by regulating GPX4 protein stability via OTUB1 [J]. Oncogene, 2023, 42(2): 83-98.

[17] Sukumar J, Gast K, Quiroga D, et al. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2021, 21(2): 135-148.

Chin J Clin Pharmacol Ther 2026 Jul; 31(7)

Ginkgetin suppresses proliferation and migration of triple-negative breast cancer cells by inducing ferroptosis via the GPX4/OTUB1 axis

YANG Feng[1], SHI Wei[1], WANG Huiling[2], ZHENG Zitong[3]

[1] Department of Pharmacy, Hunan Provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410006, Hunan, China; [2] Department of Breast and Thyroid Surgery, Hunan Provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410006, Hunan, China; [3] Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421000, Hunan, China

ABSTRACT **AIM**: To investigate the effects of Ginkgetin on ferroptosis in triple-negative breast cancer (TNBC) cells and explore its anti-tumor mechanism via regulating the GPX4/OTUB1 axis. **METHODS**: MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were divided into vehicle control (0.1% DMSO), Ginkgetin treatment groups (5, 10, 20 μmol/L), and combination intervention groups (20 μmol/L Ginkgetin + 10 μmol/L Fer-1 or 20 μmol/L DFP). Cell viability was detected by CCK-8 assay; cell proliferation was assessed via EdU staining; colony formation assay was used to evaluate proliferative capacity; cell migration and invasion were measured by Transwell assay; intracellular reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and Fe^{2+} levels were quantified by flow cytometry; mitochondrial morphology was observed using transmission electron microscopy (TEM); protein expression (GPX4, OTUB1) was analyzed by Western blot; GPX4-OTUB1 interaction was studied by co-immunoprecipitation (Co-IP); and co-localization of GPX4 and OTUB1 was observed by immunofluorescence. **RESULTS**: CCK-8, EdU staining, colony formation assay, and Transwell assays demonstrated that Ginkgetin treatment significantly reduced the proliferation, invasion, and migration of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells in a dose-dependent manner. Ferroptosis-related assays revealed that Ginkgetin-treated cells exhibited markedly increased intracellular ROS levels, lipid peroxidation products, and Fe^{2+} content (P<0.01), accompanied by significantly reduced glutathione (GSH) levels (P<0.01). These effects were partially reversed by ferroptosis inhibitors (Fer-1, DFP). Additionally, Fer-1 and DFP restored cell migration and invasion capabilities. TEM confirmed mitochondrial ultrastructural changes characteristic of ferroptosis. Western blot showed that Ginkgetin significantly downregulated GPX4 expression (P<0.01) and promoted its ubiquitination-dependent degradation. Co-IP confirmed that Ginkgetin inhibited the interaction between OTUB1 and GPX4 (P<0.01). **CONCLUSION**: Ginkgetin exerts anti-TNBC effects by inhibiting the OTUB1-GPX4 interaction, promoting GPX4 ubiquitination and degradation, and thereby inducing ferroptosis.

KEYWORDS Ginkgetin; triple-negative breast cancer; ferroptosis; glutathione peroxidase 4; deubiquitinase OTUB1