

# 小白菊内酯对人非小细胞肺癌 A549 细胞铁死亡的影响及其作用机制研究

李景尧 邱琳 高瑞阳 王嘉耕 葛科立

(青岛大学青岛医学院, 山东 青岛 266073)

**[摘要]** **目的** 探讨小白菊内酯(PN)对人非小细胞肺癌 A549 细胞铁死亡的影响及其作用机制。**方法** 以不同浓度 PN 和去铁胺(DFO)处理 A549 细胞,通过 CCK-8 法检测细胞活力。将 A549 细胞分为 A~D 组,其中 A 组细胞不加入任何药物处理,B 组细胞加入 PN(30  $\mu\text{mol/L}$ )处理,C 组和 D 组细胞经 DFO(50  $\mu\text{mol/L}$ )预处理 1 h 后,C 组加入 DFO(50  $\mu\text{mol/L}$ )处理,D 组加入 PN(30  $\mu\text{mol/L}$ )+DFO(50  $\mu\text{mol/L}$ )联合处理。通过透射电镜观察各组细胞中线粒体结构,通过 JC-1 法检测各组细胞中线粒体膜电位,通过 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染色法、二价铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )荧光法、硫代巴比妥酸比色法、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)法分别检测各组细胞内活性氧(ROS)、 $\text{Fe}^{2+}$ 、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)的水平,通过蛋白免疫印迹(WB)实验检测各组细胞中 DRP1、SLC7A11、GPX4、TFR1、FSP1 蛋白的相对表达水平。**结果** CCK-8 实验结果显示,随着 PN 浓度升高,A549 细胞活力逐渐降低,而 DFO 能够逆转这一状况( $F=144.80\sim 4\ 287.00, q=11.68\sim 57.47, P<0.05$ )。透射电镜结果显示,B 组细胞线粒体体积明显萎缩、嵴结构消失,同时伴随细胞膜破裂及空泡化改变,而 D 组细胞线粒体形态较 B 组显著改善。线粒体膜电位检测结果显示,B 组细胞线粒体膜电位显著低于 A 组,C、D 组细胞线粒体膜电位显著高于 B 组( $F=514.70, q=42.75\sim 46.68, P<0.05$ )。生化指标检测结果显示,B 组细胞中 GSH 水平显著低于 A 组, $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS 及 MDA 水平显著高于 A 组,而 D 组细胞中 GSH 水平显著高于 B 组细胞, $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS 及 MDA 水平显著低于 B 组( $F=57.24\sim 11\ 646.00, q=14.88\sim 218.70, P<0.05$ )。WB 实验结果显示,B 组细胞中 DRP1、TFR1 蛋白表达水平显著高于 A 组,GPX4、SLC7A11 蛋白的表达水平显著低于 A 组,而 D 组细胞中 DRP1、TFR1 蛋白的表达水平显著低于 B 组,SLC7A11 蛋白表达水平显著高于 B 组( $F=160.60\sim 14\ 969.00, q=5.68\sim 278.30, P<0.05$ )。**结论** PN 能够诱导 A549 细胞发生铁死亡,其机制可能与抑制 SLC7A11-GSH-GPX4 轴的信号传导有关。

**[关键词]** 癌,非小细胞肺;A549 细胞;小白菊内酯;去铁胺;铁死亡;细胞死亡逆转;SLC7A11 蛋白质;谷胱甘肽过氧化酶;谷胱甘肽

**[中图分类号]** R734.2

**[文献标志码]** A

## Effect of parthenolide on ferroptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells and its mechanism of action

LI Jingyao, QIU Lin, GAO Ruiyang, WANG Jiageng, GE Keli (Qingdao Medical College of Qingdao University, Qingdao 266073, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the effect of parthenolide (PN) on ferroptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells and its mechanism of action. **Methods** A549 cells were treated with different concentrations of PN and deferoxamine (DFO), and CCK-8 assay was used to measure cell viability. A549 cells were divided into groups A, B, C, and D. The cells in group A were not given any drug treatment. The cells in group B were treated with PN (30  $\mu\text{mol/L}$ ). The cells in groups C and D were pretreated with DFO (50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 1 hour; then, the cells in group C were further treated with DFO (50  $\mu\text{mol/L}$ ), while those in group D were treated with PN (30  $\mu\text{mol/L}$ )+DFO (50  $\mu\text{mol/L}$ ). Transmission electron microscopy was used to observe mitochondrial structure; JC-1 assay was used to measure mitochondrial membrane potential; DCFH-DA staining, ferrous iron fluorescence assay, thiobarbituric acid assay, and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) assay were used to measure the levels of reactive oxygen species (ROS),  $\text{Fe}^{2+}$ , malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) in each group; Western blot was used to measure the protein relative expression levels of DRP1, SLC7A11, GPX4, TFR1, and FSP1 in each group. **Results** CCK-8 assay showed that A549 cell viability gradually decreased with the increase in PN concentration, and DFO could reverse this effect ( $F=144.80\sim 4\ 287.00, q=11.68\sim 57.47, P<0.05$ ). Transmission electron microscopy showed that group B exhibited marked mitochondrial shrinkage and loss of cristae structure, accompanied by cell membrane rupture and vacuolization, and group D showed significant improvements in mitochondrial morphology compared with group B. Measurement of mitochondrial membrane potential

showed that group B had a significantly lower mitochondrial membrane potential than group A, and groups C and D had a significantly higher mitochondrial membrane potential than group B ( $F=514.70, q=42.75\sim 46.68, P<0.05$ ). Biochemical analyses

**[收稿日期]** 2025-11-18; **[修订日期]** 2026-03-04

**[基金项目]** 中国博士后科学基金面上项目(2020M6-

82132)

**[通信作者]** 葛科立,Email:ntfadu@163.com

showed that compared with group A, group B had a significantly lower level of GSH and significantly higher levels of  $\text{Fe}^{2+}$ , ROS, and MDA, and compared with group B, group D had a significantly higher level of GSH and significantly lower levels of  $\text{Fe}^{2+}$ , ROS, and MDA ( $F=57.24-11\ 646.00, q=14.88-218.70, P<0.05$ ). Western blot showed that compared with group A, group B had significantly higher protein expression levels of DRP1 and TFR1 and significantly lower protein expression levels of GPX4 and SLC7A11, and compared with group B, group D had significantly lower protein expression levels of DRP1 and TFR1 and a significantly higher protein expression level of SLC7A11 ( $F=160.60-14\ 969.00, q=5.68-278.30, P<0.05$ ). **Conclusion** PN can induce ferroptosis in A549 cells, possibly by inhibiting signal transduction along the SLC7A11-GSH-GPX4 axis.

**[KEY WORDS]** Carcinoma, non-small-cell lung; A549 cells; Parthenolide; Deferoxamine; Ferroptosis; Cell death reversal; SLC7A11 protein; Glutathione peroxidase; Glutathione

目前非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)发病率占肺癌总数的 85% 以上,是临床最常见的肺癌类型<sup>[1]</sup>。目前其常规治疗手段包括手术、化疗、靶向治疗等<sup>[2]</sup>,但在临床实践中,NSCLC 患者的复发率与远处转移率仍处于较高水平,严重影响患者的预后及生存质量,因此亟待寻找安全有效的辅助治疗药物与新的作用靶点,以改善患者预后。铁死亡是一种铁离子依赖性的、以活性氧(ROS)累积和谷胱甘肽(GSH)耗竭为特征的程序性细胞死亡方式。研究显示,溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)-GSH-谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)通路是调控细胞铁死亡的关键信号通路,该通路的激活可提高细胞的抗氧化能力,并且抑制脂质过氧化反应的发生,从而避免细胞发生铁死亡<sup>[3-5]</sup>。铁螯合剂去铁胺(DFO)可通过螯合细胞内的游离铁离子,抑制脂质过氧化及铁死亡相关分子异常表达,进而防止细胞发生铁死亡,其作为经典铁死亡抑制剂,被广泛应用于细胞铁死亡相关研究<sup>[6-8]</sup>。小白菊内酯(PN)是中药小白菊的重要活性成分,已被证实具有明确的抗肿瘤作用,其可通过消耗细胞内 GSH 和削弱细胞抗氧化能力,进而促进铁死亡发生。目前,PN 对 NSCLC 细胞铁死亡的影响以及具体机制尚不明确。本研究拟探讨 PN 对于人 NSCLC 细胞(A549 细胞)铁死亡的影响,以及 SLC7A11-GSH-GPX4 通路在其中可能的作用,为 NSCLC 的辅助治疗提供新的理论依据和潜在药物靶点,以期为临床治疗 NSCLC 提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂

A549 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。PN 粉末(货号 S2341)、DFO 粉末(货号 S5742)均购自美国 Selleck 公司,胎牛血清(货号 CY101)、RPMI-1640 培养基(货号 CB004)、胰酶(货号 CB011)、PBS(货号 CB012)、RIPA 裂解液(货号 PC101)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号

ZJ102)、PVDF 膜(货号 WJ002、WJ001S)及 TBST(货号 TF103)均购自上海雅酶生物医药科技有限公司,青霉素-链霉素混合液(货号 P1400)、GSH 检测试剂盒(货号 BC1175)均购自北京索莱宝科技有限公司,CCK-8 法检测试剂盒(货号 BS350B)、ROS 检测试剂盒(货号 BL714A)、JC-1 增强型线粒体膜电位检测试剂盒(货号 BL1213A)均购自北京兰杰柯科技有限公司,二价铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )检测试剂盒(货号 MA0647-1)购自大连美仑生物科技有限公司,丙二醛(MDA)检测试剂盒(货号 S0131S)购自上海碧云天生物技术有限公司,DRP1 一抗、TFR1 一抗、GPX4 一抗、山羊抗兔 IgG 二抗(货号 340336、R381603、R381958、511203)均购自成都正能生物技术有限责任公司,SLC7A11 一抗(货号 F0517)购自美国 Selleck 公司,GAPDH 一抗、 $\beta$ -Tubulin(货号 LF211S、LF214S)均购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

### 1.2 CCK-8 法检测 PN 和 DFO 对 A549 细胞活力的影响

A549 细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液的 RPMI-1640 培养基中,置于细胞培养箱(37 °C、含体积分数 0.05  $\text{CO}_2$ )中培养,取处于对数生长期的细胞进行后续实验。细胞分组和处理方法如下:①将 A549 细胞接种于 96 孔板中(约  $8 \times 10^3$  个细胞/孔),分为对照组和 6 个实验组,每组设置 6 个复孔;其中对照组细胞孔中不加入 PN,只加入溶剂 DMSO( $<0.1\%$ ),6 个实验组细胞孔中分别加入不同浓度 PN(2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0  $\mu\text{mol/L}$ ),置于细胞培养箱中培养 24 h。②将 A549 细胞接种于 96 孔板中(约  $8 \times 10^3$  个细胞/孔),分为对照组和 4 个实验组,每组设置 6 个复孔;其中对照组细胞孔中不加入 DFO,只加入溶剂 DMSO( $<0.1\%$ ),4 个实验组细胞孔中分别加入不同浓度 DFO(25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ),置于细胞培养箱中培养 24 h。③将 A549 细胞接种于 96 孔板中(约  $8 \times 10^3$  个细胞/孔),分为对照组和 7 个实验

组,每组设置 5 个复孔;其中,对照组细胞孔中加入溶剂 DMSO( $<0.1\%$ ),3 个 PN 单独处理的实验组细胞孔分别加入 20、25、30  $\mu\text{mol/L}$  PN,其余 4 个实验组细胞孔先加入 50  $\mu\text{mol/L}$  DFO 预处理 1 h,而后分别加入 0、20、25、30  $\mu\text{mol/L}$  PN 联合处理,各组细胞均置于培养箱中培养 24 h。④将 A549 细胞接种于 96 孔板中(约  $8 \times 10^3$  个细胞/孔),分为对照组和 3 个实验组,每组设置 3 个复孔;其中,对照组细胞孔中加入溶剂 DMSO( $<0.1\%$ ),PN 单独处理的实验组细胞孔加入 30  $\mu\text{mol/L}$  PN,其余 2 个实验组细胞孔先加入 50  $\mu\text{mol/L}$  DFO 预处理 1 h,而后分别加入 0、30  $\mu\text{mol/L}$  PN 联合处理,各组细胞均置于培养箱中分别培养 6、12、24 h。取上述各组细胞,按照 CCK-8 法检测试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪于 450 nm 波长下检测各组吸光度值,并且计算细胞活力。细胞活力=(实验组吸光度值-空白孔吸光度值)/(对照组吸光度值-空白孔吸光度值)。

### 1.3 透射电镜观察各组细胞中线粒体结构

取处于对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中(约  $1 \times 10^5$  个细胞/孔),分为 A~D 组,每组设置 3 个复孔;其中 A 组细胞不加入任何药物,只加入 DMSO( $<0.1\%$ )作为溶剂对照,B 组细胞加入 PN (30  $\mu\text{mol/L}$ )进行处理,C 组和 D 组细胞经 DFO (50  $\mu\text{mol/L}$ )预处理 1 h 之后,C 组细胞加入 DFO (50  $\mu\text{mol/L}$ )处理,D 组细胞加 PN (30  $\mu\text{mol/L}$ ) + DFO (50  $\mu\text{mol/L}$ )联合处理,各组细胞均置于培养箱中培养 24 h。取 A~D 组细胞,经过胰酶消化后 3 000 r/min 离心 3~5 min,弃去上清液,加入电镜固定液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  下避光固定 24 h。经 PBS 漂洗,1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,醋酸铀块染,环氧丙烷过渡后树脂浸透、包埋、聚合,超薄切片后铅染色,置于透射电镜下成像并拍照。

### 1.4 JC-1 法检测各组细胞线粒体膜电位

取培养 24 h 后的 A~D 组细胞,弃去原培养液后,PBS 清洗,每孔加入 1 mL RPMI-1640 培养基与 1 mL JC-1 染色液,混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 20 min,弃去上清液,加入 JC-1 缓冲液清洗 2 次,再加入 2 mL RPMI-1640 培养基,置于倒置荧光显微镜下观察,后计算各组 JC-1 聚合物和 JC-1 单体的平均荧光强度,以 JC-1 聚合物和 JC-1 单体的比值代表各组细胞线粒体膜电位高低。

### 1.5 各组细胞中 ROS、 $\text{Fe}^{2+}$ 、GSH、MDA 水平检测

取培养 24 h 后的 A~D 组细胞,在室温下使用

2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)溶液染色 30 min,置于倒置荧光显微镜下观察并计算各组平均荧光强度,以此代表各组细胞中 ROS 水平;同时按照相应试剂盒说明书进行操作,分别通过  $\text{Fe}^{2+}$  荧光法、硫代巴比妥酸比色法、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)法,检测各组细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ 、MDA、GSH 水平。ROS、 $\text{Fe}^{2+}$  及 GSH 水平均以相对比值表示,相对比值=各组检测值/A 组检测值的平均值。

### 1.6 蛋白免疫印迹(WB)实验检测各组细胞中各蛋白的表达水平

取培养 24 h 后的 A~D 组细胞,使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜、封闭后,分别与相应一抗及山羊抗兔 IgG 二抗孵育,采用化学发光法显影并采集图像,以 GAPDH、 $\beta$ -Tubulin 为内参进行定量分析。使用的抗体及其稀释比如下:Drp1 一抗(1:1 000)、TFR1 一抗(1:1 000)、SLC7A11 一抗(1:1 000)、GPX4 一抗(1:1 000)、GAPDH 一抗(1:5 000)、 $\beta$ -Tubulin 一抗(1:5 000),山羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)。

### 1.7 统计学处理

使用 GraphPad Prism10.1.2 进行数据分析。经正态性和方差齐性检验后,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析比较单一自变量下多组计量资料间的差异,采用双因素方差分析评估两个自变量及其交互作用对因变量的影响,多重比较采用 Tukey 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 PN 和 DFO 对 A549 细胞活力的影响

CCK-8 实验结果显示,不同浓度 PN、DFO 以及两者的联合处理均会对 A549 细胞活力产生显著影响( $F = 144.80 \sim 644.30, P < 0.05$ )。其中,与不加入 PN 处理的细胞相比,10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  的 PN 处理后细胞活力均显著降低( $q = 13.99 \sim 57.47, P < 0.05$ ),见图 1A。与不加入 DFO 处理的细胞相比,100、200  $\mu\text{mol/L}$  的 DFO 处理后细胞活力显著降低( $q = 5.18, 44.77, P < 0.05$ ),而 25、50  $\mu\text{mol/L}$  的 DFO 处理后细胞活力无显著变化( $P > 0.05$ ),提示该浓度范围内 DFO 没有明显的细胞毒性,选取 50  $\mu\text{mol/L}$  DFO 进行后续实验,见图 1B。与不加入 PN 处理的细胞相比,不同浓度 PN 单独处理下

细胞活力均显著降低( $q=11.68\sim35.73, P<0.05$ );与 30  $\mu\text{mol/L}$  PN 单独处理后的细胞相比较,PN (30  $\mu\text{mol/L}$ )+DFO(50  $\mu\text{mol/L}$ )联合处理后的细胞活力显著升高( $q=13.66, P<0.05$ );而与 20、25  $\mu\text{mol/L}$  PN 单独处理后的细胞相比,PN (20、25  $\mu\text{mol/L}$ )+DFO(50  $\mu\text{mol/L}$ )联合处理后的细胞活力无显著变化( $P>0.05$ ),见图 1C。双因素方差分析结果显示,药物处理因素、时间因素及两者相互作用均对细胞活力存在显著影响( $F_{\text{药物处理}}=667.90, F_{\text{时间}}=4\ 287.00, F_{\text{交互}}=1\ 301.00, P<0.05$ );与 30  $\mu\text{mol/L}$  PN 处理的细胞相比,不同时间点时 PN (30  $\mu\text{mol/L}$ )+DFO(50  $\mu\text{mol/L}$ )联合处理的细胞活力均显著升高( $q=14.14\sim22.45, P<0.001$ ),见图 1D。

## 2.2 各组 A549 细胞中线粒体的形态学特征和膜电位比较

透射电镜结果显示,A 组细胞中线粒体形态规

整,体积正常,嵴结构清晰完整(如红色箭头所示);与 A 组相比,B 组细胞中线粒体明显萎缩,嵴结构显著破坏甚至消失,并伴有细胞膜破裂及空泡化(如蓝色箭头所示);C 组细胞中线粒体形态及嵴结构未见明显异常,整体形态与 A 组基本一致(如红色箭头所示);与 B 组相比,D 组细胞中线粒体体积基本恢复,嵴结构恢复清晰规整,空泡化明显减轻,细胞结构完整性显著提升(如绿色箭头所示)。见图 2。线粒体膜电位检测结果显示,A~D 组细胞线粒体膜电位分别为  $2.567\pm0.058$ 、 $0.583\pm0.076$ 、 $2.400\pm0.100$ 、 $2.550\pm0.050$ ,各组间比较差异具有统计学意义( $F=514.70, P<0.05$ );与 A 组相比,B 组线粒体膜电位显著降低( $q=46.68, P<0.05$ ),C 组、D 组无显著差异( $P>0.05$ );与 B 组相比,C 组、D 组细胞的线粒体膜电位显著升高( $q=42.75$ 、 $46.28, P<0.05$ );与 C 组相比,D 组细胞线粒体膜电位无显著差异( $P>0.05$ )。

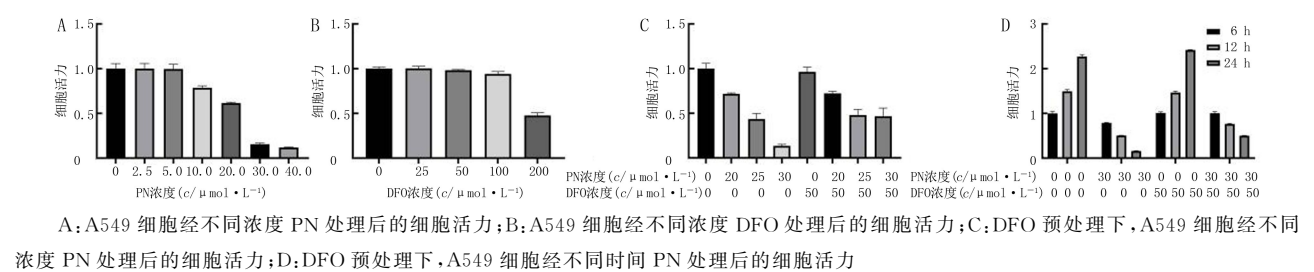


图 1 PN 和(或)DFO 处理对 A549 细胞活力的影响

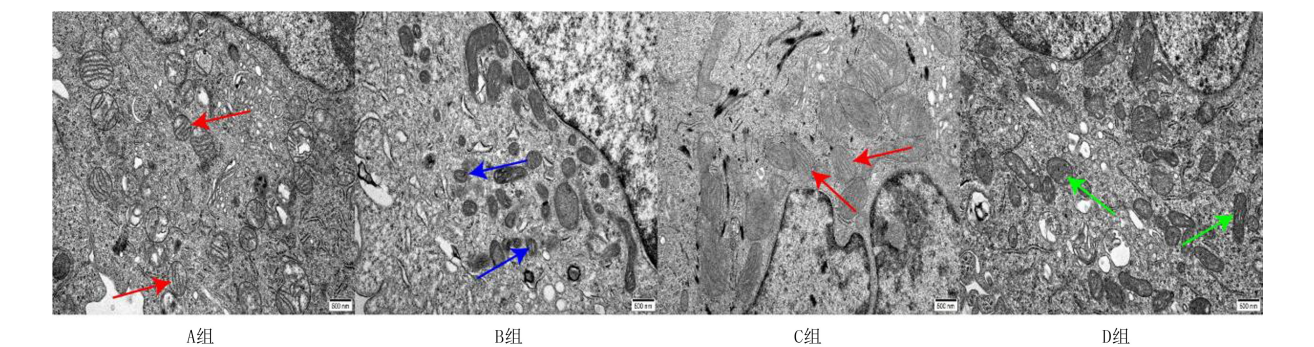


图 2 A~D 组细胞中线粒体的形态学特征(透射电镜,放大 25 000 倍)

## 2.3 各组 A549 细胞中 $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS、GSH 及 MDA 水平比较

A~D 组细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS、GSH 及 MDA 水平比较均具有显著性差异( $F=57.24\sim11\ 646.00, P<0.05$ )。与 A 组相比,B 组细胞中 GSH 水平显著降低( $q=15.67, P<0.05$ ), $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS 及 MDA 水平显著升高( $q=31.15\sim218.70, P<0.05$ );与 A 组相比,C 组细胞中上述各指标均无显著差异( $P>0.05$ );与 B 组相比,D 组细胞中 GSH 水平显著升高

( $q=14.88, P<0.05$ ), $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS 及 MDA 水平显著降低( $q=28.03\sim215.80, P<0.05$ );与 C 组相比,D 组细胞中上述各指标均无显著差异( $P>0.05$ )。见表 1。

## 2.4 各组细胞中 DRP1 及铁死亡相关蛋白表达水平比较

WB 实验结果显示,A~D 组细胞中 DRP1、GPX4、SLC7A11 和 TFR1 蛋白相对表达水平均有显著差异( $F=160.60\sim14\ 969.00, P<0.05$ ),FSP1

蛋白相对表达水平无显著差异( $P>0.05$ );与 A 组相比,B、C、D 组 DRP1 和 TFR1 蛋白相对表达水平显著升高( $q=49.91\sim 278.30,P<0.05$ ),GPX4 以及 SLC7A11 蛋白相对表达水平均显著性降低( $q=5.68\sim 74.71,P<0.05$ );与 B 组相比,C、D 组 DRP1 和 TFR1 蛋白相对表达水平显著降低( $q=50.93\sim 228.30,P<0.05$ ),C 组 GPX4 和 SLC7A11 蛋白相对表达水平显著升高( $q=18.87、55.26,P<0.05$ ),D 组仅 SLC7A11 蛋白的相对表达水平显著升高( $q=59.95,P<0.05$ );与 C 组进行比较,D 组 DRP1 以及 SLC7A11 蛋白的相对表达水平显著性升高( $q=$

25.11、4.69, $P<0.05$ ),GPX4 和 TFR1 蛋白相对表达水平显著降低( $q=18.61、64.84,P<0.05$ )。见表 2、图 3、图 4。

表 1 A~D 组细胞中  $Fe^{2+}$ 、ROS、GSH 及 MDA 水平比较( $n=3,\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | $Fe^{2+}$        | ROS              | GSH              | MDA<br>( $b/mol\cdot kg^{-1}$ ) |
|-----|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|
| A 组 | $1.000\pm 0.086$ | $1.000\pm 0.118$ | $1.000\pm 0.108$ | $1.267\pm 0.015$                |
| B 组 | $2.872\pm 0.096$ | $3.070\pm 0.146$ | $0.391\pm 0.005$ | $3.230\pm 0.020$                |
| C 组 | $1.013\pm 0.047$ | $1.163\pm 0.069$ | $0.966\pm 0.058$ | $1.320\pm 0.010$                |
| D 组 | $1.005\pm 0.076$ | $1.208\pm 0.114$ | $0.969\pm 0.054$ | $1.293\pm 0.015$                |

表 2 A~D 组细胞中 DRP1 及铁死亡相关蛋白相对表达水平比较( $n=3,\bar{x}\pm s$ )

| 组别  | DRP1             | GPX4             | SLC7A11          | FSP1             | TFR1             |
|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| A 组 | $0.306\pm 0.007$ | $0.989\pm 0.009$ | $1.890\pm 0.007$ | $1.205\pm 0.048$ | $0.405\pm 0.026$ |
| B 组 | $1.509\pm 0.005$ | $0.483\pm 0.022$ | $0.627\pm 0.007$ | $1.274\pm 0.150$ | $1.987\pm 0.010$ |
| C 组 | $0.522\pm 0.010$ | $0.872\pm 0.057$ | $1.561\pm 0.057$ | $1.247\pm 0.096$ | $1.536\pm 0.011$ |
| D 组 | $0.630\pm 0.006$ | $0.488\pm 0.035$ | $1.640\pm 0.008$ | $1.272\pm 0.163$ | $0.961\pm 0.008$ |

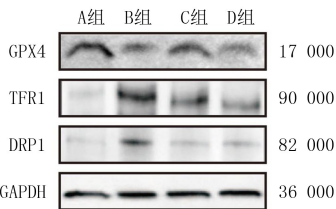


图 3 A~D 组细胞中 DRP1、GPX4 和 TFR1 蛋白表达水平

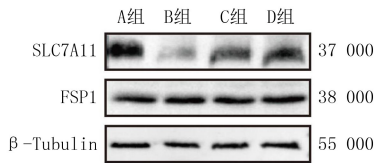


图 4 A~D 组细胞中 SLC7A11 和 FSP1 蛋白表达水平

3 讨 论

NSCLC 是肺癌中最常见的病理亚型,占肺癌总发病率的 85% 以上,起病隐匿,多数患者确诊时已处于中晚期,易错失最佳手术治疗时机<sup>[9]</sup>。目前其常规治疗手段包括手术切除、化疗、靶向治疗及免疫治疗等,但仍存在原发或继发性耐药、复发率与远处转移率偏高、治疗不良反应明显等问题,导致患者 5 年生存率不佳,亟待寻找安全有效的辅助治疗药物及新型抗肿瘤靶点<sup>[10]</sup>。铁死亡是一种程序性细胞死亡方式,其核心调控通路 SLC7A11-GSH-GPX4 及铁代谢相关蛋白(TFR1、FSP1)与 NSCLC 的发病及耐药密切相关,促进肿瘤细胞铁死亡可抑制肿瘤进展<sup>[11]</sup>。有研究表明,倍半萜内酯类化合物可通过扰乱肿瘤细胞的氧化还原稳态促进其发生铁死

亡<sup>[12-13]</sup>。PN 分子中含有  $\alpha$  亚甲基  $\gamma$  内酯结构,该结构属于迈克尔受体,可与靶蛋白中半胱氨酸残基的巯基等亲核基团发生迈克尔加成反应,进而对相关靶蛋白进行共价修饰并发挥抗炎以及抗肿瘤作用<sup>[14]</sup>。有研究显示,PN 可促进肝细胞癌细胞中 GSH 氧化和脂质过氧化并下调 GPX4 表达,而铁抑制剂-1 能够部分逆转其细胞毒性<sup>[15]</sup>。然而,PN 对 NSCLC 细胞铁死亡的影响及其具体机制尚未明确。本研究以 A549 细胞为研究对象,评估 PN 对其线粒体形态、线粒体膜电位和铁死亡相关分子表达水平的影响,并探讨 SLC7A11-GSH-GPX4 通路在 PN 影响 A549 细胞铁死亡中的作用,为 PN 能够应用于 NSCLC 辅助治疗提供实验依据。

本研究结果显示,PN 浓度升高可使 A549 细胞活力逐渐降低,提示 PN 对 A549 细胞的增殖具有浓度依赖性抑制作用。DFO 是一种经典的铁螯合剂,常作为铁死亡抑制剂用于科学研究,其主要通过减少细胞内游离铁蓄积和抑制脂质过氧化发挥对细胞铁死亡的保护作用<sup>[16]</sup>。本研究中,经 30  $\mu\text{mol/L}$  PN 与 50  $\mu\text{mol/L}$  DFO 联合处理后,A549 细胞活力较 PN 单独处理后的细胞明显升高,而较低浓度 PN(20、25  $\mu\text{mol/L}$ )与 DFO 联合处理后未见细胞活力有显著的提高,提示 PN 诱导的细胞损伤可能与铁死亡有关,DFO 可对其产生部分逆转作用。有研究显示,熊果酸处理后 A549 细胞的活力下降可被 DFO 部分挽救,说明铁死亡参与肺癌细胞的死亡过程<sup>[17]</sup>,与本研究上述结果相符。双因素方差分

析结果显示,药物处理(PN、DFO 或两者联合)、作用时间及两者交互作用均对 A549 细胞活力具有显著影响,且在处理不同时间点时,PN 和 DFO 联合处理后 A549 细胞活力均显著高于 PN 单独处理的细胞,提示 PN 对 A549 细胞增殖的抑制作用具有时间累积效应,而 DFO 的保护作用也具有一定持续性。上述结果共同提示,PN 能够诱导 A549 细胞发生铁死亡。

铁死亡在形态学上的典型特征主要表现为线粒体体积缩小、膜密度增加、嵴减少甚至消失,线粒体异常是细胞铁死亡在超微结构层面的判断依据。既往研究显示,粉防己碱诱导肺腺癌细胞铁死亡时,可见明显的线粒体皱缩和嵴减少<sup>[18]</sup>。在线粒体功能方面,线粒体膜电位下降提示线粒体内膜受损及功能障碍<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示,PN 处理后 A549 细胞中线粒体体积明显萎缩、嵴结构消失,并伴随细胞膜破裂及空泡化改变,同时线粒体膜电位显著降低;而 DFO 的干预可使线粒体体积基本恢复、嵴结构恢复清晰、空泡化明显减轻、线粒体膜电位恢复,提示 PN 可诱导 A549 细胞发生线粒体损伤,而 DFO 能够对此产生明显改善作用。上述结果从超微结构层面表明,PN 能够诱导 A549 细胞发生铁死亡。

细胞铁死亡典型生化特征表现为  $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS、MDA 升高和 GSH 降低<sup>[11]</sup>。 $\text{Fe}^{2+}$  是 Fenton 反应的物质基础,其升高提示细胞内游离铁负荷增加<sup>[21]</sup>。ROS 是反映细胞内氧化应激水平的重要指标,其积聚提示氧化损伤加重<sup>[22]</sup>。GSH 是维持 GPX4 活性和清除脂质过氧化物的关键还原底物,其耗竭意味着细胞抗氧化防御能力下降<sup>[23]</sup>。MDA 是脂质过氧化的经典终产物,其升高提示着细胞中脂质过氧化增强<sup>[18]</sup>。本研究的结果显示,PN 处理后 A549 细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS 及 MDA 水平均显著升高,而 GSH 水平显著降低,提示 PN 可诱导细胞内游离铁积聚、氧化应激增强、脂质过氧化加重及抗氧化防御能力下降;而 DFO 的干预则可使 A549 细胞中  $\text{Fe}^{2+}$ 、ROS 以及 MDA 显著性减少,GSH 显著性增多,提示 DFO 可明显逆转 PN 诱导的铁依赖性氧化损伤。上述结果从分子层面表明,PN 能够诱导 A549 细胞发生铁死亡。

有研究表明,在发生铁死亡的细胞中,TFR1、DRP1 蛋白表达水平升高,GPX4、SLC7A11、FSP1 蛋白表达水平降低<sup>[24]</sup>。TFR1 是介导铁离子进入细胞的重要受体,其升高提示铁内流增加和铁死亡易感性增强<sup>[25]</sup>。DRP1 是调控线粒体分裂的关键蛋

白,其升高通常提示细胞中线粒体过度分裂<sup>[26]</sup>。GPX4 是清除脂质过氧化物、抑制细胞铁死亡的核心分子,SLC7A11 是胱氨酸/谷氨酸反向转运系统的重要组成部分,参与胱氨酸转运和 GSH 合成,两者共同构成经典的 SLC7A11-GSH-GPX4 抗氧化轴<sup>[27-28]</sup>。同时,FSP1 则是独立于 GSH-GPX4 轴之外的抑制细胞铁死亡的关键的因子<sup>[29]</sup>。有研究显示,在肺癌中,促进 GPX4 降解或者抑制 SLC7A11 介导的胱氨酸摄取功能均可显著促进肺癌细胞铁死亡,而 DRP1 活化也可促进线粒体碎裂,从而加速肺癌细胞铁死亡进程<sup>[30-31]</sup>。本研究结果显示,PN 处理后 A549 细胞中 DRP1、TFR1 表达水平显著升高,GPX4、SLC7A11 表达水平显著降低,而 FSP1 表达水平无明显变化,提示 PN 可促进线粒体分裂、增强铁摄取并抑制 SLC7A11-GPX4 抗氧化轴,从而诱导 A549 细胞发生铁死亡;而 DFO 的干预可使 A549 细胞中 DRP1、TFR1 的表达水平显著下降,SLC7A11 表达水平显著回升,提示 DFO 能够改善 A549 细胞当中线粒体稳态失衡以及铁代谢紊乱。上述研究结果表明,PN 可能通过调控 SLC7A11-GSH-GPX4 轴的信号传导,以诱导 A549 细胞发生铁死亡。

综上所述,PN 能够诱导 A549 细胞发生铁死亡,其机制可能与抑制 SLC7A11-GSH-GPX4 轴的信号传导有关。本研究有望为 PN 对 NSCLC 的潜在治疗价值提供实验依据和理论参考,未来仍需结合体内实验及更深入的分子机制研究,进一步明确 PN 调控 NSCLC 细胞铁死亡的关键靶点及其临床转化价值。

**作者声明:**李景尧、葛科立、高瑞阳参与了研究设计;李景尧、邱琳、王嘉耕参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] KARIRI Y A. Update on the treatment of non-small cell lung carcinoma (NSCLC)[J]. J Clin Med, 2025,14(19):6960.
- [2] WANG J, BIGLOW L, BAUMGART M. Emerging targets in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer Targets Ther, 2025,16:115-124.
- [3] DUO K, FENG X N, TIAN X F, et al. Ferroptosis inhibitors: Mechanisms of action and therapeutic potential[J]. Cell Mol Life Sci, 2025,82(1):441.
- [4] CHEN F Q, KANG R, TANG D L, et al. Ferroptosis: Principles and significance in health and disease[J]. J Hematol Oncol, 2024,17(1):41.

- [5] ZHANG X D, LIU Z Y, WANG M S, et al. Mechanisms and regulations of ferroptosis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1269451.
- [6] LIANG Y D, WANG Y, SUN C, et al. Deferoxamine reduces endothelial ferroptosis and protects cerebrovascular function after experimental traumatic brain injury[J]. *Brain Res Bull*, 2024, 207:110878.
- [7] KANNAN M, SIL S, OLADAPO A, et al. HIV-1 Tat-mediated microglial ferroptosis involves the miR-204-ACSL4 signaling axis[J]. *Redox Biol*, 2023, 62:102689.
- [8] CHEN Y F, LI X T, WANG S Y, et al. Targeting iron metabolism and ferroptosis as novel therapeutic approaches in cardiovascular diseases[J]. *Nutrients*, 2023, 15(3):591.
- [9] SUN Y N, MA L, ZHANG X F, et al. Advances in the treatment of rare mutations in non-small cell lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2024, 17:1095-1115.
- [10] HUANG Q, LI Y X, HUANG Y D, et al. Advances in molecular pathology and therapy of non-small cell lung cancer[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2025, 10(1):186.
- [11] WEI Z Q, ZHOU Z L, ZHANG Y, et al. PRKAA2 promotes tumor growth and inhibits ferroptosis through SLC7A11/GSH/GPX4 pathway in non-small cell lung cancer[J]. *Bio-technol Appl Biochem*, 2025, 72(4):954-962.
- [12] CHANG M T, TSAI L C, NAKAGAWA-GOTO K, et al. Phyto-sesquiterpene lactones DET and DETD-35 induce ferroptosis in vemurafenib sensitive and resistant melanoma *via* GPX4 inhibition and metabolic reprogramming[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178:106148.
- [13] YANG M H, BAEK S H, JUNG Y Y, et al. Activation of autophagy, paraptosis, and ferroptosis by micheliolide through modulation of the MAPK signaling pathway in pancreatic and colon tumor cells[J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 263:155654.
- [14] EIBES S, LAKSHMI R B, RAJENDRAPRASAD G, et al. Parthenolide disrupts mitosis by inhibiting ZNF207/BUGZ-promoted kinetochore-microtubule attachment[J]. *EMBO J*, 2025, 44(13):3764-3793.
- [15] LOBIANCO F V, KRAGER K J, JOHNSON E, et al. Parthenolide induces rapid thiol oxidation that leads to ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Front Toxicol*, 2022, 4: 936149.
- [16] JIA H R, LIU X L, CAO Y Y, et al. Deferoxamine ameliorates neurological dysfunction by inhibiting ferroptosis and neuroinflammation after traumatic brain injury[J]. *Brain Res*, 2023, 1812:148383.
- [17] YANG L L, FANG Y, WANG Y L, et al. Ursolic Acid induces ferroptosis by affecting redox balance and FADS2-mediated unsaturated fatty acid synthesis in non-small cell lung cancer[J]. *J Cancer*, 2025, 16(8):2553-2566.
- [18] MO X C, HU D, YUAN K S, et al. Tetrandrine citrate suppresses lung adenocarcinoma growth *via* SLC7A11/GPX4-mediated ferroptosis[J]. *Discov Oncol*, 2023, 14(1):85.
- [19] ZHOU Q, DIAN Y T, HE Y, et al. Propafenone facilitates mitochondrial-associated ferroptosis and synergizes with immunotherapy in melanoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(11):e009805.
- [20] LI W H, JI T, YE J Q, et al. Ferroptosis enhances the therapeutic potential of oncolytic adenoviruses KD01 against cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2025, 32(4):403-417.
- [21] FAN J, LIN H R, LUO J H, et al. 4-Methoxydalbergione inhibits the tumorigenesis and metastasis of lung cancer through promoting ferroptosis *via* the DNMT1/system Xc-/GPX4 pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2025, 31(1):19.
- [22] JANG S K, AHN S H, KIM G, et al. Inhibition of VDAC1 oligomerization blocks cysteine deprivation-induced ferroptosis *via* mitochondrial ROS suppression[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(11):811.
- [23] MA N, ZHANG M W, HU J Q, et al. Daphnetin induces ferroptosis in ovarian cancer by inhibiting NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155876.
- [24] YE T, ZHANG N, ZHANG A B, et al. The influence of ferroptosis on the *in vitro* OGD/R model in rat microglia[J]. *Neurol Res*, 2024, 46(10):947-955.
- [25] WANG W C, MA Z K, FENG X M, et al. TfR1 mediated iron metabolism dysfunction as a potential therapeutic target for osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1):71.
- [26] PEDRERA L, PRIETO CLEMENTE L, DAHLHAUS A, et al. Ferroptosis triggers mitochondrial fragmentation *via* Drp1 activation[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1):40.
- [27] HU Z S, HAO W H, DAI W Q, et al. Nrf2 alleviates colistin-induced nephrotoxicity by suppressing ferroptosis *via* GPX4-mediated lipid peroxidation and mitochondrial protection[J]. *J Agric Food Chem*, 2025, 73(24):15281-15295.
- [28] LIU Z J, LIANG L N, LU S M, et al. Citrus rhoifolin alleviated DSS-induced acute colitis by activating CEMIP/SLC7A11-mediated cystine uptake and inhibiting epithelial ferroptosis [J]. *Eur J Nutr*, 2024, 64(1):20.
- [29] NAKAMURA T, MISHIMA E, YAMADA N, et al. Integrated chemical and genetic screens unveil FSP1 mechanisms of ferroptosis regulation[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, 30(11):1806-1815.
- [30] ZHAO L P, WANG H J, HU D, et al.  $\beta$ -Elemene induced ferroptosis *via* TFEB-mediated GPX4 degradation in EGFR wide-type non-small cell lung cancer[J]. *J Adv Res*, 2024, 62: 257-272.
- [31] CHEN P, LV X, ZHENG Z L. Gigantol exerts anti-lung cancer activity by inducing ferroptosis *via* SLC7A11-GPX4 axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 690:149274.