

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.007

· 基础研究 ·

## 圣草次苷通过抑制STAT3/GPX4通路诱导食管癌 KYSE30 细胞铁死亡

江蒲<sup>a</sup>, 张娜<sup>b</sup>, 高坤<sup>a</sup>, 靳晶<sup>c</sup> (河北医科大学第四医院 a. 胸外科; b. 胸部放疗一科; c. 肿瘤研究所, 河北 石家庄 050000)

**[摘要]** **目的:** 探讨圣草次苷对食管癌 KYSE30 细胞增殖的影响, 并基于铁死亡探讨其可能的作用机制。 **方法:** 将食管癌 KYSE30 细胞分为 8 组: 对照组 (常规培养)、RSL3 组 (用 3  $\mu\text{mol/L}$  铁死亡诱导剂 RSL3 处理)、圣草次苷组 (用 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)、圣草次苷 + Fer-1 组 (用 5  $\mu\text{mol/L}$  铁死亡抑制剂 Fer-1 + 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)、Fer-1 组 (用 5  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1 处理)、oe-NC 组 (转染空白载体对照)、oe-STAT3 组 (转染 STAT3 过表达载体)、oe-STAT3 + 圣草次苷组 (转染 STAT3 过表达载体后, 用 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)。采用 CCK-8 法、EdU 掺入实验和克隆形成实验分别检测各组细胞的增殖能力, ELISA 检测细胞内铁死亡相关指标的水平, WB 法检测 STAT3/GPX4 通路相关蛋白的表达。构建 KYSE30 细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 观察圣草次苷及 Fer-1 对移植瘤生长的影响。 **结果:** 圣草次苷能够抑制 KYSE30 细胞增殖和克隆形成, 增加活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA)、 $\text{Fe}^{2+}$  水平, 降低谷胱甘肽 (GSH) 水平 (均  $P < 0.05$ ), 并抑制裸鼠移植瘤的生长, 这些作用能够被 Fer-1 所逆转 ( $P < 0.05$ )。STAT3 过表达可消除圣草次苷对铁死亡的诱导效应及其对 STAT3/GPX4 通路的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。 **结论:** 圣草次苷能够通过抑制 STAT3/GPX4 信号通路来诱导食管癌 KYSE30 细胞铁死亡, 从而在食管癌中发挥显著的抗肿瘤效应。

**[关键词]** 食管癌; KYSE30 细胞; 圣草次苷; 铁死亡; 活性氧; STAT3/GPX4 信号通路

**[中图分类号]** R735.1; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)03-0281-07

## Eriocitrin induces ferroptosis in esophageal cancer KYSE30 cells by inhibiting the STAT3/GPX4 pathway

JIANG Pu<sup>a</sup>, ZHANG Na<sup>b</sup>, GAO Kun<sup>a</sup>, JIN Jing<sup>c</sup> (a. Department of Thoracic Surgery; b. Department of Thoracic Radiation Oncology I; c. Cancer Research Institute, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Eriocitrin on the proliferation of esophageal cancer KYSE30 cells, and to explore its possible mechanism based on ferroptosis. **Methods:** Esophageal cancer KYSE30 cells were divided into 8 groups: the control group (conventional culture), RSL3 group (treated with 3  $\mu\text{mol/L}$  ferroptosis inducer RSL3), Eriocitrin group (treated with 75  $\mu\text{mol/L}$  Eriocitrin), Eriocitrin + Fer-1 group (treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  of ferroptosis inhibitor Fer-1 and 75  $\mu\text{mol/L}$  Eriocitrin), Fer-1 group (treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1 treatment), oe-NC group (transfected with blank vector control), oe-STAT3 group (transfected with STAT3 overexpression vector) and oe-STAT3 + Eriocitrin group (transfected with STAT3 overexpression vector and then treated with 75  $\mu\text{mol/L}$  Eriocitrin). Proliferation abilities of cells in each group were detected using CCK-8 assay, EdU incorporation assay and clone formation assay respectively. The levels of intracellular ferroptosis-related indicators were detected using the ELISA kits. Western blotting was used to detect the expression of STAT3/GPX4 pathway-related proteins. KYSE30 cell nude mouse subcutaneous transplanted tumor model was constructed to observe the effects of Eriocitrin and Fer-1 on the growth of transplanted tumors. **Results:** Eriodictyol could inhibit the proliferation and clone formation of KYSE30 cells, increase the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and  $\text{Fe}^{2+}$ , decrease the level of glutathione (GSH) (all  $P < 0.05$ ) and suppress the growth of transplanted tumors in nude mice. These effects could be reversed by Fer-1 ( $P < 0.05$ ). Overexpression of STAT3 could abolish the inductive effect of eriodictyol on ferroptosis and its inhibitory effect on the STAT3/GPX4 pathway ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Eriocitrin could induce ferroptosis in esophageal cancer KYSE30 cells by inhibiting STAT3/GPX4 signaling pathway and exert significant antitumor effects in esophageal cancer.

**[Key words]** esophageal cancer; KYSE30 cell; Eriocitrin; ferroptosis; reactive oxygen species (ROS); STAT3/GPX4 signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(3): 281-287. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.03.007]

**[基金项目]** 河北省自然科学基金 (No. H2022206546)

**[作者简介]** 江蒲 (1985—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事食管癌的基础与临床治疗研究。E-mail: wo94000@21cn.com

**[通信作者]** 高坤, E-mail: 18531113217@163.com

食管癌发病率位居全球常见癌症的第8位,是癌症相关死亡的第6大原因<sup>[1]</sup>。食管腺癌和食管鳞状细胞癌是两种主要的组织学亚型,占食管癌的95%以上。尽管在过去的几十年里,食管癌的治疗方法有了一些进展,但其预后仍然很差,总体5年生存率仅为18%<sup>[2]</sup>。在临床上开发新型靶向治疗药物是提高患者生存率和整体生活质量的关键,而这就需要进一步深入了解食管癌的发病机制。铁死亡是一种依赖于铁和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的程序性细胞死亡,在形态学、生物化学和基因水平上有别于细胞凋亡、自噬和坏死,诱导铁死亡被认为是一种新的抗肿瘤策略<sup>[3-4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>发现,一些天然植物提取物(如青蒿素、艾门冬酰胺黄酮、芦荟苷元、没食子酸、二氢异丹参酮 I 等)通过铁死亡作用展现出显著的抗肿瘤效果。圣草次苷(Eriocitrin)是一种天然的类黄酮化合物,广泛存在于柑橘类水果中,因其具有多种药理活性,包括抗肿瘤、抗炎、抗纤维化、抗寄生虫和心脏保护作用等而受到关注<sup>[6]</sup>。圣草次苷可通过触发铁死亡抑制肺腺癌细胞的上皮间质转化<sup>[7]</sup>;在肝细胞癌中,圣草次苷可通过促进 ROS 的合成抑制癌细胞增殖和迁移<sup>[8]</sup>。然而,圣草次苷在食管癌细胞中的作用及其机制尚未明确。本研究旨在深入探讨圣草次苷对食管癌细胞增殖的影响,并基于铁死亡探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、实验动物及与主要试剂

人食管癌细胞 KYSE30 购自武汉普诺塞有限公司,人正常食管上皮细胞 HEEC 购自宁波明舟生物科技有限公司。4~6 周龄、18~22 g 的 BALB/c 雄性小鼠购自河北医科大学(实验动物公共服务平台),生产许可证号为 SCXK(冀)2020-001。本研究经动物伦理委员会审批通过(伦理审批号:2024KY247)。

圣草次苷(货号:CFN99718)购自武汉 ChemFaces 公司,铁死亡诱导剂 RSL3(纯度 $\geq 99\%$ )、铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1;纯度 $\geq 99\%$ )购自美国 MedChemExpress 公司,2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFDA)试剂盒均购自美国 Sigma 公司, Lipofectamine 3000 转染试剂、RPMI 1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司, STAT3 过表达载体(oe-STAT3)及其空白载体对照(oe-NC)购自美国 MyBioSource 公司, TRIzol 试剂购自德国 Roche 公司,细胞计数法-8(CCK-8)试剂盒、总谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,抗 GPX4 抗体、抗 SLC7A11 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 p-STAT3 抗体、抗 GAPDH 抗体、山羊

抗兔 IgG H&L (HRP)标记抗体均购自英国 Abcam 公司。

### 1.2 细胞培养及分组处理

所有细胞均采用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基,于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 环境中培养。在 96 孔板中培养 24 h 后,加入不同浓度(25、50、75、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$ )的圣草次苷<sup>[7]</sup>继续培养 24 h,对照组加入等体积的培养基。

为研究圣草次苷对食管癌细胞铁死亡的影响,将细胞分为 5 组:对照组(常规培养)、RSL3 组(用 3  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理)、圣草次苷组(用 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)、圣草次苷 + Fer-1 组(用 5  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1 + 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)、Fer-1 组(用 5  $\mu\text{mol/L}$  Fer-1 处理)。为研究对圣草次苷对 STAT3/GPX4 通路的影响,将细胞分为 4 组:oe-NC 组(转染空白载体对照)、oe-STAT3 组(转染 STAT3 过表达载体)、oe-STAT3 + 圣草次苷组(转染 STAT3 过表达载体后,用 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)、圣草次苷组(用 75  $\mu\text{mol/L}$  圣草次苷处理)。对于细胞转染,将对数生长期的细胞接种至 6 孔板中,待细胞汇合度至 80% 时,根据 Lipofectamine 3000 使用说明书将 oe-STAT3 及其对照 oe-NC 分别转染至细胞。转染至 24 h 后,采用 qPCR 和 WB 法检测转染效率。

### 1.3 CCK-8 法检测圣草次苷对 KYSE30 细胞增殖活力的影响

根据 CCK-8 试剂盒说明,将各组细胞以  $4 \times 10^3$  个/孔的密度培养在 96 孔板中,于每个孔中加入 CCK-8 溶液(10  $\mu\text{L}$ /孔),在 37 °C 下培养 3 h 后,使用微孔分光光度计在 450 nm 波长处测定光密度( $D$ )值。依据公式“细胞增殖率=(实验组  $D$  值 - 空白对照  $D$  值)/(对照组  $D$  值 - 空白对照  $D$  值) $\times 100\%$ ”计算细胞增殖率。

### 1.4 EdU 掺入实验检测圣草次苷对 KYSE30 细胞增殖的影响

将各组细胞以  $4 \times 10^3$  个/孔的密度接种在 96 孔板中,加入 EdU 溶液作用 12 h 后,弃去培养基,使用 4% 多聚甲醛固定 15 min,用 0.3% Triton X-100 通透 10 min。然后用 Hoechst 33342 标记 30 min。使用荧光显微镜观察 EdU 阳性细胞,依据公式“EdU 阳性细胞率=(EdU 阳性细胞数/Hoechst 阳性细胞总数) $\times 100\%$ ”计算 EdU 阳性细胞率。

### 1.5 克隆形成实验检测圣草次苷对 KYSE30 细胞克隆形成的影响

将细胞以 300 个/孔的密度接种于 6 孔板,培养 14 d 后用 75% 的乙醇固定细胞 30 min,然后用 0.2% 的结晶紫染色,计数细胞克隆数量。

## 1.6 荧光探针DCFDA法检测KYSE30细胞内的ROS水平

将细胞与10  $\mu\text{mol/L}$ 的DCFDA一起培养30 min,然后用荧光微孔板阅读器在480 nm的激发波长和530 nm的发射波长下测量荧光强度。以未经DCFDA处理的细胞作为测量背景荧光。荧光强度即代表细胞内ROS含量。

## 1.7 ELISA检测KYSE30细胞中GSH、MDA和 $\text{Fe}^{2+}$ 的含量

分别使用总GSH测定试剂盒、MDA检测试剂盒和 $\text{Fe}^{2+}$ 检测试剂盒检测细胞内GSH、MDA和 $\text{Fe}^{2+}$ 水平。所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

## 1.8 透射电子显微镜观察KYSE30细胞线粒体形态变化

细胞经消化、离心后,收集细胞沉淀。经电镜固定液固定24 h后,用四氧化锇固定25 min。经PBS、梯度乙醇脱水后,包埋于环氧树脂中。制备电镜切片,用醋酸双氧铀和醋酸铅染色,于透射电子显微镜下观察线粒体形态变化。

## 1.9 WB法检测KYSE30细胞中GPX4、SLC7A11、STAT3、p-STAT3蛋白的表达

使用含PMSF的RIPA蛋白裂解液提取总蛋白,使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白经10%SDS-PAGE凝胶电泳转移至PVDF膜上,转膜后在5%脱脂牛奶中于室温下封闭1 h,而后于4  $^{\circ}\text{C}$ 下在GPX4(1:10 000)、SLC7A11(1:2 000)、STAT3(1:2 000)、p-STAT3(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)一抗中过夜。次日室温下于二抗中反应1 h。TBST清洗后,使用ECL发光液显色,用Image J软件

分析蛋白质条带的灰度值。

## 1.10 KYSE30细胞裸鼠移植瘤模型的构建及观察

将KYSE30细胞( $4 \times 10^6$ 个/200  $\mu\text{L}$ )悬液注射于BALB/c裸鼠的右侧腋窝皮下,以构建移植瘤模型。1周时,当肿瘤肉眼可见时,根据随机数字表法将小鼠分为3组(每组5只):对照组、圣草次苷组(100 mg/kg圣草次苷灌胃<sup>[8]</sup>,1次/d)和圣草次苷+Fer-1组(100 mg/kg圣草次苷灌胃,1次/d;配合尾静脉注射5 mg/kg Fer-1,1次/周)。每3 d测量一次肿瘤体积,肿瘤体积的计算公式为:体积=长 $\times$ 宽 $^2 \times 0.52$ 。给药21 d后处死小鼠,对瘤体组织进行称质量并拍照。

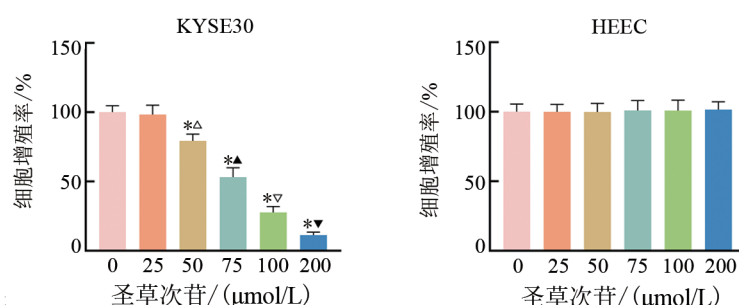
## 1.11 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。使用SPSS 21.0进行数据分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 $t$ 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析,并采用LSD进行组间两两比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 圣草次苷降低食管癌KYSE30细胞的增殖活力

CCK-8法结果(图1)显示,圣草次苷能够以剂量依赖性的方式降低食管癌KYSE30细胞增殖率显著降低(均 $P < 0.05$ ),而几乎不影响人正常食管上皮细胞HEEC的增殖活力( $P > 0.05$ ),表明圣草次苷对KYSE30细胞具有显著的抑制作用。圣草次苷对KYSE30细胞的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为77.0  $\mu\text{mol/L}$ ,所以,选择75  $\mu\text{mol/L}$ 的圣草次苷进行后续实验。



与0  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,\* $P < 0.05$ ;与25  $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\Delta}P < 0.05$ ;与50  $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\nabla}P < 0.05$ ;与75  $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\vee}P < 0.05$ ;  
与100  $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $^{\vee}P < 0.05$ 。

图1 CCK-8法检测圣草次苷对KYSE30、HEEC细胞增殖活力的影响

## 2.2 圣草次苷降低食管癌KYSE30细胞的增殖能力

EdU掺入实验结果(图2A,表1)显示,与对照组相比,RSL3组和圣草次苷组EdU阳性细胞率均明显降低(均 $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷+Fer-1组EdU阳性细胞率明显升高( $P < 0.05$ )。克隆形成实验结果(图2B,表1)显示,与对照组相比,

RSL3组和圣草次苷组细胞克隆数均显著降低(均 $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷+Fer-1组细胞克隆数明显增加( $P < 0.05$ )。结果表明,圣草次苷和RSL3均能显著抑制细胞的增殖及克隆形成能力,而同时使用铁死亡抑制剂Fer-1则可逆转圣草次苷对细胞增殖的抑制作用。



表1 各组 KYSE30 细胞中 EdU 阳性细胞率和细胞克隆数的比较

组别	EdU 阳性率(%)	细胞克隆数(个)
对照组	83.36 ± 7.17	252.35 ± 20.25
RSL3 组	22.57 ± 3.34*	30.65 ± 4.35*
圣草次苷组	21.34 ± 4.86*	31.34 ± 4.71*
圣草次苷 + Fer-1 组	76.54 ± 6.63* <sup>△</sup>	116.59 ± 15.36* <sup>△</sup>
Fer-1 组	87.62 ± 5.34	249.85 ± 28.64

与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与圣草次苷组相比,<sup>△</sup> $P < 0.05$

2.3 圣草次苷促进食管癌 KYSE30 细胞铁死亡

荧光探针 DCFH-DA 检测结果(图 2C,表 2)显示,与对照组相比,RSL3 组和圣草次苷组 KYSE30 细胞中 ROS 荧光强度均明显增加(均  $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷 + Fer-1 组 KYSE30 细胞中 ROS 荧光强度明显降低( $P < 0.05$ )。进一步检测细胞

内 MDA、GSH 和  $Fe^{2+}$  水平发现,与对照组相比,RSL3 组和圣草次苷组 MDA 和  $Fe^{2+}$  水平明显升高(均  $P < 0.05$ ),且 GSH 水平明显降低( $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷 + Fer-1 组 MDA 和  $Fe^{2+}$  水平均明显降低(均  $P < 0.05$ )、GSH 水平明显升高( $P < 0.05$ )。透射电子显微镜观察结果(图 2D,表 2)发现,经圣草次苷处理后,KYSE30 细胞中线粒体外膜破裂、体积变小、染色加深;加入 Fer-1 后,细胞线粒体变大、染色变浅。WB 法实验结果(图 2E,表 2)显示,与对照组相比,圣草次苷组 GPX4 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),而 SLC7A11 蛋白表达无明显变化( $P > 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷 + Fer-1 组中 GPX4 蛋白表达明显增加( $P < 0.05$ )。实验结果表明,圣草次苷和 RSL3 均有促进细胞铁死亡的作用,而同时使用 Fer-1 则可逆转圣草次苷对细胞铁死亡的促进作用。

表2 各组 KYSE30 细胞中铁死亡相关分子或蛋白表达水平比较

组别	ROS 水平(倍数)	MDA(nmol/mg)	GSH(mU/mg)	$Fe^{2+}$ (倍数)	GPX4	SLC7A11
对照组	1.00 ± 0.03	3.36 ± 0.65	113.67 ± 8.82	1.00 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.58 ± 0.05
RSL3 组	5.36 ± 0.35*	12.25 ± 1.07*	48.39 ± 5.73*	5.94 ± 0.61*	0.11 ± 0.01*	0.22 ± 0.03*
圣草次苷组	5.77 ± 0.41*	13.74 ± 1.12*	47.66 ± 6.34*	6.03 ± 0.57*	0.10 ± 0.01*	0.53 ± 0.04
圣草次苷 + Fer-1 组	3.29 ± 0.26* <sup>△</sup>	7.76 ± 1.04* <sup>△</sup>	98.15 ± 9.79* <sup>△</sup>	3.13 ± 0.24* <sup>△</sup>	0.46 ± 0.03* <sup>△</sup>	0.61 ± 0.06
Fer-1 组	0.98 ± 0.07	3.28 ± 0.56	126.74 ± 10.17	1.03 ± 0.06	0.68 ± 0.04	0.57 ± 0.06

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与圣草次苷组相比,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

2.4 圣草次苷抑制食管癌 KYSE30 细胞的 STAT3 信号通路

WB 法检测结果(图 2F,表 3)显示,与对照组相比,RSL3 组和圣草次苷组 KYSE30 细胞中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达均明显降低(均  $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷 + Fer-1 组 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达明显升高(均  $P < 0.05$ )。结果表明,圣草次苷和 RSL3 均有抑制细胞 STAT3 信号通路的作用,而同时使用 Fer-1 则可逆转圣草次苷对细胞 STAT3 信号通路的抑制作用。

2.5 STAT3 过表达抑制食管癌 KYSE30 细胞的铁死亡

WB 法检测结果(图 2G,表 4、5)显示,与 oe-NC 组相比,oe-STAT3 组细胞中 STAT3、p-STAT3、GPX4 蛋白表达及 GSH 水平均明显增加(均  $P < 0.05$ ),ROS、MDA 和  $Fe^{2+}$  水平均明显降低(均  $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,oe-STAT3 + 圣草次苷组细胞中 STAT3、p-STAT3、GPX4 蛋白表达及 GSH 水平均明显增加(均  $P < 0.05$ ),ROS、MDA 和  $Fe^{2+}$  水平均明显降低(均  $P < 0.05$ )。结果表明,STAT3 过表达可逆转圣

草次苷对细胞铁死亡的促进作用。

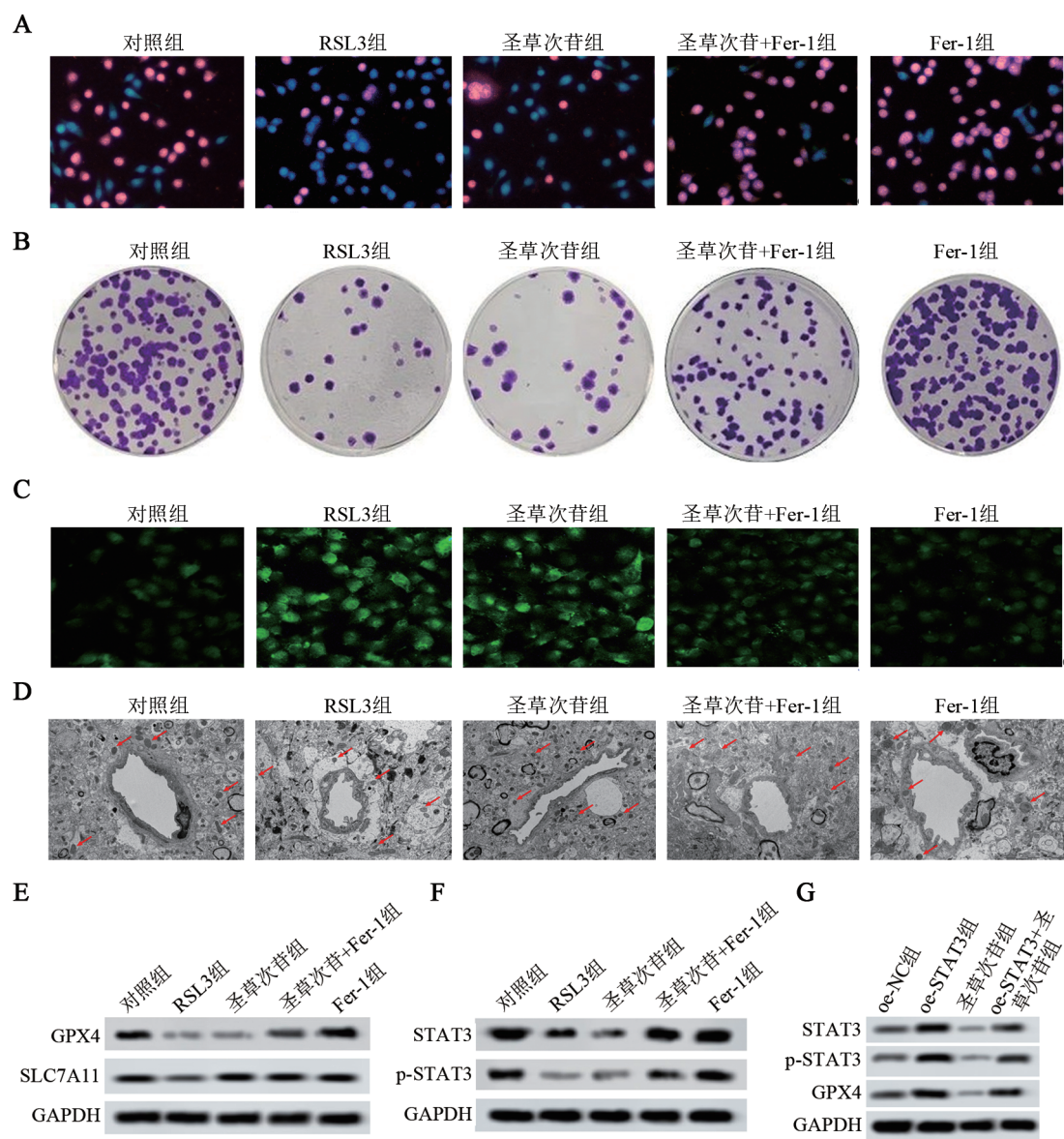
2.6 圣草次苷抑制 KYSE30 细胞裸鼠移植瘤的生长

成功构建 KYSE30 细胞裸鼠移植瘤模型(图 3)。与对照组相比,圣草次苷组裸鼠移植瘤体积和质量均明显降低(均  $P < 0.05$ );与圣草次苷组相比,圣草次苷 + Fer-1 组裸鼠移植瘤体积和质量均明显增加(均  $P < 0.05$ )。结果表明,圣草次苷在体内抑制裸鼠移植瘤的生长,而同时应用 Fer-1 则逆转圣草次苷的抑制作用而促进裸鼠移植瘤的生长。

表3 各组 KYSE30 细胞中 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的比较

组别	STAT3	p-STAT3
对照组	1.03 ± 0.04	0.63 ± 0.05
RSL3 组	0.36 ± 0.04*	0.13 ± 0.01*
圣草次苷组	0.25 ± 0.03*	0.17 ± 0.02*
圣草次苷 + Fer-1 组	0.93 ± 0.06 <sup>△</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>△</sup>
Fer-1 组	1.07 ± 0.06	0.69 ± 0.06

与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与圣草次苷组相比,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。



A: EdU 掺入法检测细胞增殖能力( $\times 200$ ); B: 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力; C: 荧光探针 DCFH-DA 法检测细胞内 ROS 水平; D: 透射电子显微镜观察细胞线粒体形态变化( $\times 1\,000$ ); E、F、G: WB 法检测细胞中 GPX4 与 SLC7A11 蛋白(E)、STAT3 与 p-STAT3 蛋白(F)和 GPX4 蛋白(G)的表达。  
图 2 圣草次苷及 STAT3 过表达对 KYSE30 细胞的影响

表 4 各组 KYSE30 细胞中 STAT3、p-STAT3 和 GPX4 蛋白表达比较

组 别	STAT3	p-STAT3	GPX4
oe-NC 组	$0.23 \pm 0.03$	$0.21 \pm 0.03$	$0.32 \pm 0.04$
oe-STAT3 组	$0.72 \pm 0.08^*$	$0.65 \pm 0.06^*$	$0.78 \pm 0.06^*$
圣草次苷组	$0.07 \pm 0.01^*$	$0.05 \pm 0.01^*$	$0.04 \pm 0.01^*$
oe-STAT3 + 圣草次苷组	$0.35 \pm 0.05^\Delta$	$0.43 \pm 0.05$	$0.49 \pm 0.07^\Delta$

与 oe-NC 组相比,  $^*P < 0.05$ ; 与圣草次苷组相比,  $^\Delta P < 0.05$ 。

3 讨 论

目前,天然植物提取物已被视为抗肿瘤药物的重要来源,这不仅源自其化学结构和生物活性的多

样性,还因为其相比化学合成药物具有更低的毒性和不良反应。圣草次苷是从柠檬等柑橘类水果中分离出的天然化合物,在多种人类肿瘤类型中表现出抗肿瘤活性<sup>[9-10]</sup>。本研究首次证实,圣草次苷能够在体外明显抑制食管癌 KYSE30 细胞的增殖,体内实验也证实其能够延缓荷瘤裸鼠移植瘤的生长。因此,圣草次苷是一种抗食管癌进展的潜在候选药物。

铁死亡是一种新的细胞死亡形式,依赖于铁,以脂质过氧化为特征<sup>[11]</sup>。从生物化学角度看,细胞内铁超载、GSH 耗竭、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性降低以及 ROS、脂质过氧化物(如 MDA)累积都会导致铁死亡。从微观结构上看,铁死亡通常与线粒体体

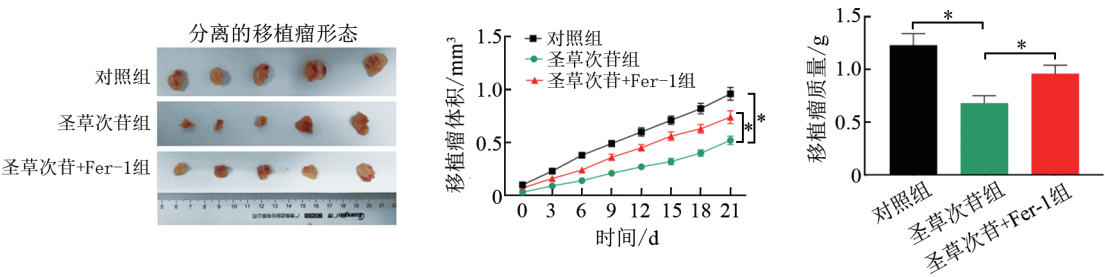
积缩小、双层膜密度增加、线粒体嵴减少或消失有关。本研究发现,与铁死亡诱导剂RSL3类似,圣草次苷处理可使食管癌细胞内ROS、MDA和Fe<sup>2+</sup>水平上调,而使GSH水平下调。同时,透射电镜观察细胞微观结构发现,经圣草次苷处理后,食管癌细胞线粒

体变小,线粒体膜密度增加,线粒体嵴减少。此外,挽救实验显示,圣草次苷对食管癌细胞增殖和克隆形成的抑制作用能够在一定程度被Fer-1所消除。这些发现证实了圣草次苷诱导的铁死亡促进食管癌细胞死亡的能力。

表5 各组KYSE30细胞中铁死亡相关标志物水平的比较

组别	ROS水平(倍数)	MDA(nmol/mg)	GSH(mU/mg)	Fe <sup>2+</sup> (倍数)
oe-NC组	1.00 ± 0.03	3.36 ± 0.45	113.67 ± 11.63	1.00 ± 0.03
oe-STAT3组	0.33 ± 0.02 <sup>*</sup>	0.75 ± 0.18 <sup>*</sup>	348.39 ± 15.87 <sup>*</sup>	0.44 ± 0.67 <sup>*</sup>
圣草次苷组	5.69 ± 0.34 <sup>*</sup>	13.74 ± 0.62 <sup>*</sup>	47.66 ± 6.25 <sup>*</sup>	6.03 ± 0.62 <sup>*</sup>
oe-STAT3 + 圣草次苷组	3.34 ± 0.16 <sup>△</sup>	5.76 ± 0.77 <sup>△</sup>	98.15 ± 10.36 <sup>△</sup>	3.13 ± 0.34 <sup>△</sup>

与oe-NC组相比,<sup>\*</sup>P < 0.05;与圣草次苷组相比,<sup>△</sup>P < 0.05。



<sup>\*</sup>P < 0.05。

图3 圣草次苷和Fer-1对荷瘤小鼠移植瘤体积和质量的影响

在基因水平上,铁死亡受到多种途径的调控。GPX4是GPX家族的成员,其以GSH为辅助因子将脂质过氧化物转化为脂醇,从而抑制铁死亡,GSH的合成是GPX4活性所必需的<sup>[12]</sup>。半胱氨酸是合成GSH的限速前体,而SLC7A11是一种多通道穿膜蛋白,其介导胱氨酸/谷氨酸拮抗剂的活性,调节GSH的合成,从而影响铁死亡<sup>[13]</sup>。因此,GPX4、SLC7A11被认为是诱导铁死亡的重要靶点<sup>[14-15]</sup>。本研究进一步检测了GPX4和SLC7A11铁死亡调节因子的表达水平,结果表明圣草次苷处理能够使GPX4蛋白表达均下调,但几乎不影响SLC7A11蛋白的表达,提示圣草次苷对食管癌细胞中铁死亡的诱导作用可能是通过调控GPX4来介导的。

GPX4受多种分子的调控,包括STAT3。ZHANG等<sup>[16]</sup>发现,STAT3可以与GPX4启动子区域结合并促进其转录。STAT3是一种氧化反应性转录因子,在铁死亡中发挥积极作用<sup>[17]</sup>。研究<sup>[18]</sup>显示,STAT3抑制剂可以通过激活细胞的铁死亡来增强对顺铂的敏感性。在胃癌中也发现,抑制STAT3可下调SLC7A11、GPX4和FTH1的表达,从而触发铁死亡,抑制肿瘤生长并降低胃癌细胞的化学耐药性<sup>[19]</sup>。此外,YUAN等<sup>[20]</sup>发现,圣草次苷能够通过调控

STAT3信号通路促进ROS的产生,从而诱导乳腺癌细胞凋亡。本研究也发现,圣草次苷能够抑制食管癌KYSE30细胞中STAT3蛋白的表达和磷酸化。同时,STAT3过表达能够诱导GPX4蛋白的表达,并在一定程度上逆转圣草次苷在食管癌KYSE30细胞中的铁死亡诱导效应。因此,圣草次苷可能通过抑制STAT3活化来阻断GPX4的表达,从而诱导铁死亡。本研究发现,STAT3过表达能够降低食管癌KYSE30细胞中ROS、MDA和Fe<sup>2+</sup>水平,升高GPX4、GSH水平,且铁死亡抑制剂Fer-1可恢复STAT3的表达,表明STAT3可抑制食管癌细胞铁死亡。此外,本研究还发现,圣草次苷能够抑制食管癌KYSE30细胞中STAT3蛋白的表达和磷酸化,且STAT3过表达能够在一定程度上逆转圣草次苷在食管癌细胞中的铁死亡诱导效应,表明抑制STAT3/GPX4信号通路可能是圣草次苷诱导食管癌细胞铁死亡的作用机制之一。

综上所述,圣草次苷能够通过抑制STAT3/GPX4信号通路诱导食管癌KYSE30细胞铁死亡,在食管癌细胞中发挥抗肿瘤效应。然而,本研究存在一定的局限性。首先,未确定是否有其他分子靶点参与,以及圣草次苷是否与参与抗肿瘤作用或铁死亡的多靶点蛋白结合。其次,STAT3调控食管癌KYSE30细胞



铁死亡的其他重要分子机制仍未明确。因此, 圣草次苷结合的多靶点蛋白及 STAT3 调控食管癌细胞铁死亡的分子机制仍有待进一步探讨。

## [参考文献]

- [1] 郭伟娟. 食管癌的 CT 影像诊断与 X 线钡餐造影诊断研究[J]. 影像研究与医学应用, 2021, 5(23): 179-180. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3807.2021.23.082.
- [2] HUANG F L, YU S J. Esophageal cancer: Risk factors, genetic association, and treatment[J]. *Asian J Surg*, 2018, 41(3): 210-215. DOI:10.1016/j.asjsur.2016.10.005.
- [3] 杨璐, 梁蓓蓓. 靶向线粒体代谢的抗肿瘤研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(12): 1248-1253. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.011.
- [4] ZHOU Q, MENG Y, LI D S, *et al.* Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 55[2024-04-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38453898/>. DOI:10.1038/s41392-024-01769-5.
- [5] 何丹, 李琳霏, 谭小宁, 等. 基于 p53/SLC7A11/GPX4 信号轴探讨七叶内酯诱导小鼠乳腺癌 4T1 细胞铁死亡的作用机制[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(2): 282-290. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2024.02.011.
- [6] 周慧, 张雨晴, 甘超, 等. 圣草次苷抑制肝细胞癌 SMMC-7721 细胞的增殖和迁移: 基于激活 ROS/MAPKs 信号轴[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(3): 412-419. DOI:10.12122/j.issn.1673-4254.2023.03.11.
- [7] GAO M L, LAI K, DENG Y, *et al.* Eriocitrin inhibits epithelial-mesenchymal transformation (EMT) in lung adenocarcinoma cells via triggering ferroptosis[J]. *Aging*, 2023, 15(19): 10089-10104. DOI:10.18632/aging.205049.
- [8] HE J, ZHOU D, YAN B. Eriocitrin alleviates oxidative stress and inflammatory response in cerebral ischemia reperfusion rats by regulating phosphorylation levels of Nrf2/NQO-1/HO-1/NF- $\kappa$ B p65 proteins[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(12): 757[2024-04-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32647682/>. DOI:10.21037/atm-20-4258.
- [9] 高明朗, 赖凯, 邓宇, 等. 圣草次苷通过上皮间充质转化途径抑制肺腺癌细胞的增殖及迁移[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(3): 190-197. DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20221219.001.
- [10] 张华, 周志钦, 席万鹏. 15 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64-70. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201511013.
- [11] 姜福贵, 伍俊峰, 杨标, 等. 雷公藤甲素通过 miR-34b-5p/Notch1 轴抑制骨肉瘤 U2OS 细胞增殖并诱导其铁死亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(6): 579-585. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.06.006.
- [12] 张晓红, 赵品, 蒯建科, 等. 亚精胺通过抑制细胞凋亡、ROS 生成及铁死亡减轻脂多糖诱导的小鼠心肌损伤[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(1): 166-172. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2024.01.19.
- [13] 时杰, 王永安, 孙基泽, 等. 亚硒酸钠通过活性氧(ROS)/谷胱甘肽(GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)轴诱导非小细胞肺癌 A549 细胞铁死亡[J]. 中国无机分析化学, 2024, 14(1): 124-130. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1035.2024.01.015.
- [14] 张朋飞, 章立华, 华东. Triapine 通过 ROS/GSH/GPX4 轴诱导 A549 细胞铁死亡[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(5): 833-838. DOI: 10.12360/CPB202204041.
- [15] YANG C M, WANG T X, ZHAO Y J, *et al.* Flavonoid 4, 4'-dimethoxychalcone induced ferroptosis in cancer cells by synergistically activating Keap1/Nrf2/HMOX1 pathway and inhibiting FECH[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 14-23. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.010.
- [16] ZHANG W, GONG M, ZHANG W, *et al.* Thiostrepton induces ferroptosis in pancreatic cancer cells through STAT3/GPX4 signalling[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 630[2024-04-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35859150/>. DOI:10.1038/s41419-022-05082-3.
- [17] HUANG F F, ZHANG S Z, LI X L, *et al.* STAT3-mediated ferroptosis is involved in ulcerative colitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 375-385. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.242.
- [18] LIU Q, WANG K Z. The induction of ferroptosis by impairing STAT3/Nrf2/GPx4 signaling enhances the sensitivity of osteosarcoma cells to cisplatin[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(11): 1245-1256. DOI:10.1002/cbin.11121.
- [19] OUYANG S M, LI H X, LOU L L, *et al.* Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer[J/OL]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102317[2024-04-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35483272/>. DOI:10.1016/j.redox.2022.102317.
- [20] YUAN C L, CHEN G P, JING C B, *et al.* Eriocitrin, a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells[J/OL]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(1): e22943[2024-04-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34724282/>. DOI:10.1002/jbt.22943.

[收稿日期] 2024-04-25

[修回日期] 2025-03-27

[本文编辑] 党瑞山