XXXX DOI:

七叶皂苷抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号通路促进骨肉瘤细胞铁死亡的机制研究

陈带领[1],袁　芳[2],陈长军[3],唐甜甜[4],应振栋[4],王秋入[5],董素森[6],张　磊[3*]

(1.山东第二医科大学临床医学院,山东省千佛山医院骨外科,济南　250012;2.山东省东平县人民医院肿瘤血液科,泰安　271599;3.山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)骨外科,济南　250012;4.山东中医药大学临床医学院,山东省千佛山医院骨外科,济南　250012;5.四川大学华西医院骨外科,成都　610041;6.山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)妇产科,济南　250012)

【摘　要】目的:基于铁死亡调控理论,探讨中药娑罗子活性成分七叶皂苷(Escin)对骨肉瘤细胞铁死亡的影响及其对核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)/谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)信号通路的调控机制。**方法:**选用KHOS-240S和SAOS-2两种骨肉瘤细胞系,设置对照组、Erastin组、Escin组及Escin+Ferrostatin-1(Fer-1)组。采用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit,CCK-8)法检测细胞活力;采用DCFH-DA和C11-BODIPY双荧光探针分别检测细胞内总活性氧水平及脂质过氧化水平;采用丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒测定脂质过氧化产物丙二醛含量。采用实时定量逆转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,qRT-PCR)和Western blot检测Nrf2/HO-1/GPX4信号通路中关键基因与蛋白的表达,并分析脂质过氧化产物4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal,4-HNE)的水平变化。**结果:**七叶皂苷以剂量依赖方式抑制骨肉瘤细胞增殖,显著提高脂质过氧化水平,诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡,该效应可被铁死亡特异性抑制剂Fer-1所逆转。机制研究显示,七叶皂苷可同步下调Nrf2($P<0.001$)、HO-1($P<0.001$)与GPX4($P<0.001$)蛋白表达,且该作用可被抗氧化剂维生素C(vitamin C,Vit C)逆转($P<0.05$)。检验水准$\alpha=0.05$。**结论:**七叶皂苷可通过抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号轴、诱导脂质过氧化依赖性铁死亡来发挥抗骨肉瘤作用,这为中药活性成分多靶点调控铁死亡和骨肉瘤的临床治疗提供了潜在候选药物。

【关键词】七叶皂苷;骨肉瘤;铁死亡;Nrf2/HO-1/GPX4信号通路

【中图分类号】R738.1　　**【文献标志码】**A

Mechanism of escin promoting ferroptosis in osteosarcoma cells by inhibiting the nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1/glutathione peroxidase 4 signaling pathway

Chen Dailing[1], *Yuan Fang*[2], *Chen Changjun*[3], *Tang Tiantian*[4], *Ying Zhendong*[4], *Wang Qiuru*[5], *Dong Sumiao*[6], *Zhang Lei*[3*]

(*1.Department of Orthopedic Surgery, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University; 2.Department of Oncology and Hematology, Dongping People's Hospital; 3.Department of Orthopedic Surgery, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital; 4.Department of Orthopedic Surgery, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine; 5.Department of Orthopedic Surgery, West China Hospital, Sichuan University; 6.Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of escin, the active ingredient of the Chinese herbal medicine *Aesculus chinensis* (buckeye seed), on ferroptosis in osteosarcoma cells and its regulatory mechanism on the nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)/

作者介绍:陈带领,Email:cdl202315069743385@163.com,研究方向:骨科基础与临床研究。

通信作者:张　磊,Email:1818@sdhospital.com.cn。

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(编号:ZR2023QH517);济南市临床医学科技创新计划(编号:202328059);吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(编号:320.6750.2024-15-24)。

heme oxygenase-1(HO-1)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway based on the theory of ferroptosis regulation. ***Methods***: Two osteosarcoma cell lines, KHOS-240S and SAOS-2, were selected and divided into control group, Erastin group, Escin group, and Escin+Ferrostatin-1(Fer-1) group. CCK-8 assay was used to measure cell viability; DCFH-DA and C11-BODIPY dual fluorescence probes were used to measure the levels of total reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation in cells; a malondialdehyde (MDA) assay kit was used to measure the content of the lipid peroxidation product MDA. The methods of qRT-PCR and Western blot were used to measure the expression of key genes and proteins in the Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway, and the change in the level of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal(4-HNE) was analyzed. ***Results***: Escin inhibited the proliferation of osteosarcoma cells in a dose-dependent manner, significantly increased the level of lipid peroxidation, and induced ferroptosis in osteosarcoma cells, and such effects could be reversed by the ferroptosis-specific inhibitor Fer-1. The mechanistic study showed that escin simultaneously downregulated the protein expression levels of Nrf2(P<0.001), HO-1(P<0.001), and GPX4(P<0.001), and this effect could be reversed by the antioxidant vitamin C(P<0.05). The significance level was set at α=0.05. ***Conclusion***: Escin exerts a therapeutic effect on osteosarcoma by inhibiting the Nrf2/HO-1/GPX4 signaling axis and inducing lipid peroxidation-dependent ferroptosis, which provides a potential candidate drug for multi-target regulation of ferroptosis and the clinical treatment of osteosarcoma by active components derived from Chinese herbal medicine.

【Key words】escin; osteosarcoma; ferroptosis; nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1/glutathione peroxidase 4 signaling pathway

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种常见的原发性恶性骨肿瘤,多发于青少年群体(10~30岁),常见于长骨干骺端,如股骨远端、胫骨近端及肱骨近端,其临床特征主要表现为病理性疼痛伴局部软组织肿块形成,且具有侵袭性强、早期肺转移率高的特点[1-2]。近年来,全球范围内0~24岁人群的OS发病率显著上升,新发病例数增加了三倍[3]。目前,OS的治疗多采用术前化疗、手术切除及术后化疗的综合治疗模式,尽管患者5年生存率有所提高,但术后复发、化疗耐药及转移患者预后极差,晚期病例5年生存率仍低于20%[4-5]。因此,深入解析OS的分子病理机制并开发新型治疗策略对改善患者预后具有重要意义。

近年来,程序性细胞死亡调控机制的研究为肿瘤治疗开辟了新途径,其中铁死亡因其独特的铁依赖性脂质过氧化特征而备受关注[6]。作为一种新型的程序性细胞死亡形式,铁死亡涉及多个关键生物学事件,包括线粒体嵴结构异常、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)活性的抑制以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度积累等[7]。值得注意的是,铁死亡调控与肿瘤耐药性密切相关,已有研究表明,诱导铁死亡能够有效逆转OS对化疗的抵抗,并显著增强肿瘤治疗效果[8]。因此,诱导细胞铁死亡可能为OS治疗提供重要策略,而靶向铁死亡相关通路有望成为改善OS预后的关键突破点。

七叶皂苷(Escin)是从传统中药娑罗子中提取的一种三萜皂苷类化合物,其钠盐制剂已被广泛应用于脑血管疾病和骨关节病的临床治疗。药理学研究表明,七叶皂苷具有多靶点抗肿瘤活性,如诱导肿瘤细胞周期阻滞及凋亡、抑制肿瘤血管新生、抑制肿瘤侵袭与转移、增强化疗药物疗效等[9]。最新研究发现,七叶皂苷可通过诱导乳腺癌细胞铁死亡,并与顺铂协同增强抗肿瘤效果[10]。尽管已有研究表明七叶皂苷能够通过诱导OS细胞凋亡和自噬发挥抗肿瘤作用[11],但其是否通过调控铁死亡途径发挥抗OS作用,目前尚缺乏系统性研究。因此,本研究聚焦于铁死亡调控机制,拟从核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)/GPX4信号轴揭示七叶皂苷对OS的抗肿瘤作用机制,为开发基于中药活性成分的OS靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人KHOS-240S骨肉瘤细胞系购自上海中乔新舟生物科技有限公司(ZQ0607);SAOS-2骨肉瘤细胞系购自赛维尔生物科技有限公司(STCC11404P);七叶皂苷(Escin)购自上海陶术生物科技有限公司(T3027,纯度:95.17%),Erastin、Ferrostatin-1(Fer-1)购自美国MCE公司;维生素C(vitamin C, Vit.C)购自山东第一医科大学第一附属医院;杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、胎牛血

清(fetal bovine serum,FBS)、青霉素/链霉素双抗、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;RNA提取试剂盒、荧光定量逆转录试剂盒、一步法快速制胶试剂盒、增强型化学发光检测试剂盒(enhanced chemiluminescence kit,ECL Kit)均购自南京诺唯赞Vazyme生物科技股份有限公司;放射免疫沉淀分析裂解液(radioimmunoprecipitation assay lysis buffer,RIPA)、蛋白上样缓冲液购自上海雅酶生物医药科技有限公司;聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride membrane,PVDF)购自美国默克公司;Nrf2、HO-1和β-actin抗体均购自华安生物技术有限公司;GPX4抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal,4-HNE)抗体购自博奥森生物技术有限公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒购自上海碧云天生物公司,ROS检测试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司,BODIPY™ 581/591 C11检测试剂盒购自美国Invitrogen公司,丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒购自亚科因生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

将KHOS-240S与SAOS-2人骨肉瘤细胞培养于含10% FBS及1%青霉素-链霉素的DMEM完全培养基中,置于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中常规培养。根据细胞生长密度,每2~3 d以0.25%胰酶消化传代。取处于对数生长期、生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.3 CCK-8细胞活力检测

将KHOS-240S、SAOS-2骨肉瘤细胞按5 000个/孔接种于96孔板,实验分为对照组和不同浓度七叶皂苷组。不同浓度七叶皂苷组分别加入4 μmol/L、8 μmol/L、12 μmol/L、16 μmol/L、20 μmol/L、24 μmol/L、28 μmol/L、32 μmol/L、36 μmol/L和40 μmol/L七叶皂苷处理细胞24 h。另设仅含培养基的空白孔。实验重复3次。培养结束后加入10 μL CCK-8工作液(按照说明书稀释),37 ℃孵育1 h,于酶标仪450 nm波长处测定各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率。细胞存活率=[(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)]×100%。

1.4 细胞分组及药物处理

根据处理方式不同,将细胞分为以下4组:对照组(Control):培养基中加入等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS);铁死亡诱导剂Erastin组(Erastin):培养基中加入15 μmol/L Erastin;七叶皂苷(Escin)组:培养基中加入24 μmol/L Escin;七叶皂苷组+铁死亡抑制剂Ferrostatin-1组(Escin+ Fer-1):培养基中加入24 μmol/L Escin以及1.5 μmol/L Fer-1;干预时间为24 h。

1.5 ROS检测

参照课题组前期研究方法[12],按照ROS检测试剂盒说明书配制2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA)工作液。将工作液分别加入Control组、Erastin组、Escin组及Escin+Fer-1组的细胞中,置于37 ℃、5% CO_2培养箱内避光孵育30 min。孵育结束后,使用PBS清洗细胞,于荧光显微镜下观察。DCFH-DA的激发波长为488 nm,发射波长为529 nm。采用Image J软件随机选取3个视野进行荧光强度定量,并计算平均值。所有实验均独立重复3次。

1.6 BODIPY™581/591 C11检测

按照BODIPY™ 581/591 C11检测试剂盒说明书进行操作。将细胞接种于6孔板,按"1.4"项方法分组并给予相应处理。处理结束后,用PBS清洗细胞,每孔加入1 mL浓度为1 μmol/L的BODIPY™ 581/591 C11工作液,于37 ℃避光孵育1.5 h;随后用Hoechst染液对细胞核染色15 min,再次用PBS清洗。染色完成后,使用共聚焦激光扫描显微镜进行图像采集,其中氧化通道信号采用488 nm激光激发,还原通道信号采用561 nm激光激发。采用ImageJ软件随机选取3个视野进行荧光强度(integrated optical density,IOD)定量分析并计算平均值。所有实验均独立重复3次。

1.7 Western blot检测

将细胞接种至6孔板,按照"1.4"项方法进行分组,并给予相应干预。参照课题组前期研究方法[13],在处理结束后,收集细胞,加入RIPA裂解液充分裂解,提取总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度后,取15 μl蛋白上样,进行SDS-PAGE电泳,随后转膜并封闭。封闭完成后,在4 ℃条件下孵育一抗过夜(Nrf2、HO-1、GPX4及4-HNE一抗稀释比例均为1∶1 000)。随后,以TBST稀释二抗(1∶20 000),室温孵育1 h。最后,采用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)显影,以β-actin为内参,通过Image J软件分析计算目标蛋白的相对表达量,所有实验均独立重复3次。

1.8 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测

将细胞接种于6孔板,并依据"1.4"项下的方法进行分组(每组设3个复孔)与处理。处理结束后,依照说明书提取各组细胞的总RNA,测定其浓度并逆转录为cDNA。使用qRT-PCR仪采用两步法扩增程序,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid,mRNA)的相对表达量,实验以GAPDH为内参基因。所有实验均独立重复3次。所用引物序列详见表1。

表1 qRT-PCR各基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')
GAPDH	Forward:AGAACATCATCCCTGCATCC
	Reverse:AGTTGCTGTTGAAGTCGC
Nrf-2	Forward:ATGCTTCATTCGCCTCACAAA
	Reverse:GCACTCACTGACTCGGTTGG
Ho-1	Forward:CGGAGCAAGCAACATCTCAG
	Reverse:GGGTCGTTTTCCAGGACAGT
Gpx4	Forward:CGGACCTAAAGGGGAGATGG
	Reverse:CCAGCCGCACTGAATTGAGT

1.9 MDA检测

将细胞接种至6孔板,按照"1.4"项方法进行分组,并给

予相应处理。依照MDA测定试剂盒(Apexbio,美国)说明书进行操作。收集细胞,经预冷PBS清洗后,离心弃上清,加入1 mL预冷的裂解液,于4 ℃、13 000 r/min条件下离心10 min,收集上清液备用。随后,取100 μL上清液与300 μL反应工作液充分混匀,95 ℃水浴孵育30 min;反应结束后立即置于冰上冷却,并在25 ℃、10 000 r/min条件下离心10 min。最后取上清,分别测定其在532 nm和600 nm波长处的吸光度值。根据试剂盒提供的公式计算MDA含量,所有实验均独立重复3次。

1.10 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,采用GraphPad Prism 8.4.2软件绘制统计学图表。每项检测独立重复3次,结果取均值进行分析,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有计量数据均经Levene方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),若方差齐($P > 0.05$),组间两两比较采用LSD法(Least Significant Difference test);若方差不齐,则采用Tamhane's T2法。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 七叶皂苷对骨肉瘤细胞增殖的抑制作用及浓度选择

为评估七叶皂苷(Escin)对骨肉瘤细胞增殖的影响,本研究采用CCK-8法检测不同浓度(0~40 μmol/L)七叶皂苷处理24 h后对KHOS-240S与SAOS-2细胞活力的影响。结果显示,七叶皂苷以剂量依赖的方式显著抑制两种细胞的增殖。其中,KHOS-240S细胞24 h的半数抑制浓度(IC_{50})为24.28 μmol/L(R^2=0.9777;图1A),SAOS-2细胞的IC_{50}值为24.88 μmol/L(R^2=0.9869;图1B)。基于上述结果,为平衡后续实验中的细胞毒性效应与可观测生物学反应,本研究选用24 μmol/L作为七叶皂苷的后续实验浓度。

2.2 七叶皂苷在骨肉瘤细胞中诱发氧化应激

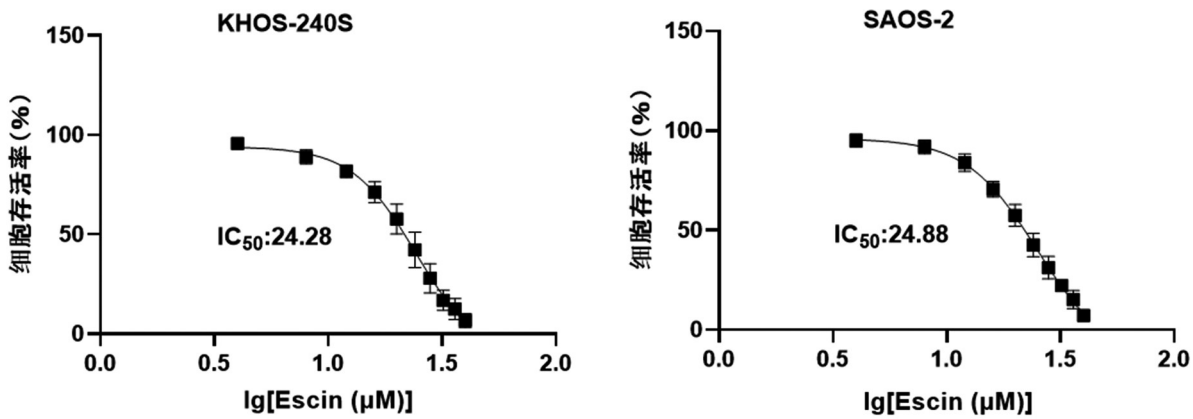
本研究采用DCFH-DA荧光探针评估七叶皂苷对骨肉瘤细胞氧化应激水平的影响,并以铁死亡诱导剂Erastin和抑制剂Ferrostatin-1(Fer-1)为对照。结果显示,在KHOS-240S细胞中,七叶皂苷处理24 h后ROS水平较对照组显著升高(F=37.65,P=0.002),且该效应可被Fer-1显著逆转(F=21.45,P=0.005;图2A、2B)。SAOS-2细胞中也观察到一致的变化趋势(F=40.63,P=0.001;F=33.68,P=0.002;图2C、2D)。

2.3 七叶皂苷促进骨肉瘤细胞脂质过氧化

本研究通过C11-BODIPY$^{581/591}$探针检测骨肉瘤细胞的脂质过氧化水平。结果显示,在KHOS-240S细胞中,七叶皂苷处理可显著增强脂质过氧化水平(F=36.87,P=0.002),而该效应可被Fer-1显著逆转(F=29.79,P=0.003;图3A、3B);SAOS-2细胞中也观察到一致趋势(F=86.08,P<0.001;F=20.49,P=0.006;图3C、3D)。进一步检测脂质过氧化产物MDA的含量。结果显示,七叶皂苷能显著提高KHOS-240S细胞中MDA水平(F=25.10,P=0.004),该作用同样可被Fer-1逆转(F=11.93,P=0.016;图3E,表2);SAOS-2细胞中亦呈现一致结果(F=26.52,P=0.004;F=22.77,P=0.005;图3F,表2)。综上所述,七叶皂苷可通过促进脂质过氧化进而诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡,从而发挥抗肿瘤作用。

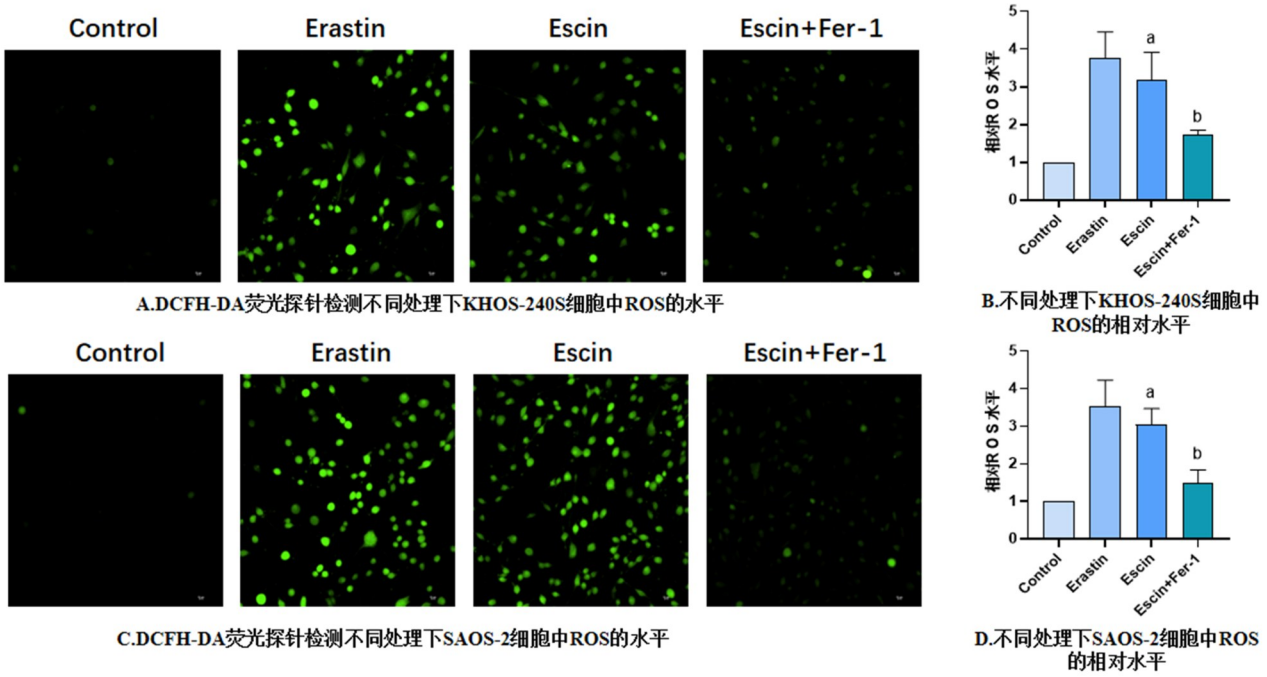
2.4 七叶皂苷对Nrf2/HO-1/GPX4信号通路的调控作用

Nrf2/HO-1/GPX4信号通路是调控细胞铁死亡的经典通路之一[14],因此,为进一步阐明七叶皂苷诱导骨肉瘤细胞铁死亡的具体机制,采用qRT-PCR和Western blot技术检测Nrf2/HO-1/GPX4通路相关基因和蛋白的表达变化。qRT-PCR结果显示,七叶皂苷能显著下调KHOS-240S细胞中Nrf2(F=22.83,P=0.005)、HO-1(F=24.16,P=0.004)及GPX4(F=15.00,P=0.011)的mRNA表达,而这些变化亦可被Fer-1干预部分逆转(F=15.51,P=0.011;F=15.90,P=0.010;F=20.99,P=0.007;表3)。Western blot实验进一步证实,七叶皂苷在蛋白层面同样显著抑制了Nrf2(F=29.35,P=0.003)、HO-1(F=13.03,P=0.015)及GPX4(F=35.70,P=0.002)的表达,并伴随脂质过氧化标志物4-HNE水平的显著升高(F=21.10,P=0.006),而这些变化亦可被Fer-1干预所部分逆转



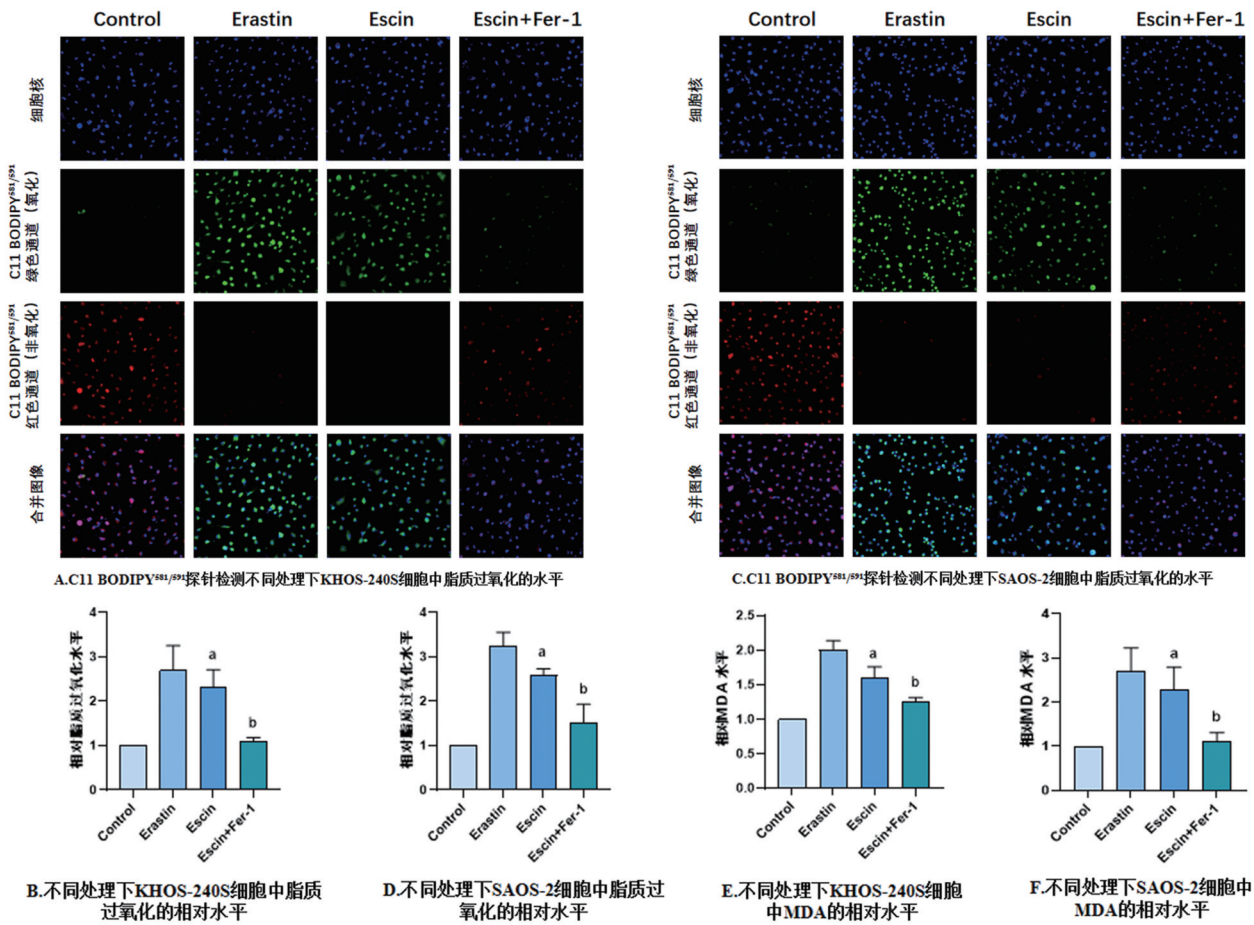
A.七叶皂苷对KHOS-240S细胞存活率的剂量依赖性抑制作用　　B.七叶皂苷对SAOS-2细胞存活率的剂量依赖性抑制作用

图1 七叶皂苷对骨肉瘤细胞存活率的剂量依赖性抑制作用及半数抑制浓度(IC_{50})测定



注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与Escin组比较，$P<0.05$（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

图2　DCFH–DA荧光探针观察不同处理对骨肉瘤细胞中ROS水平的影响



注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与Escin组比较，$P<0.05$（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

图3　C11 BODIPY581/591荧光探针以及MDA检测观察不同处理对骨肉瘤细胞中脂质过氧化水平的影响

（F=41.44，P=0.001；F=15.07，P=0.011；F=39.46，P=0.002；F=25.48，P=0.004；图4A、4B，表5）。上述基因与蛋白水平的调控趋势在SAOS-2细胞中均得到重复验证（表4、表6；图4C、4D）。这些结果一致表明，七叶皂苷可能通过抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号通路，诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡。

表2 各组骨肉瘤细胞MDA表达量（$\bar{x}\pm s$，nmol/mg prot，n=3）

组别	KHOS-240S	SAOS-2
对照组	0.47 ± 0.07	0.31 ± 0.14
Erastin组	0.95 ± 0.20	0.79 ± 0.21
Escin组	0.76 ± 0.19[a]	0.66 ± 0.18[a]
Escin+Fer-1组	0.59 ± 0.08[b]	0.32 ± 0.09[b]

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Escin组比较，P<0.05

表3 KHOS-240S骨肉瘤细胞各组Nrf-2、HO-1、GPX4 mRNA相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	Nrf-2	Ho-1	GPX4
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Erastin组	0.27 ± 0.14	0.32 ± 0.06	0.36 ± 0.10
Escin组	0.36 ± 0.13[a]	0.43 ± 0.12[a]	0.53 ± 0.08[a]
Escin+Fer-1组	0.69 ± 0.14[b]	0.77 ± 0.15[b]	0.95 ± 0.13[b]

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Escin组比较，P<0.05

表4 SAOS-2骨肉瘤细胞各组Nrf-2、HO-1、GPX4 mRNA相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	Nrf-2	Ho-1	GPX4
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Erastin组	0.29 ± 0.13	0.31 ± 0.12	0.26 ± 0.07
Escin组	0.46 ± 0.11[a]	0.42 ± 0.14[a]	0.37 ± 0.09[a]
Escin+Fer-1组	0.77 ± 0.12[b]	0.75 ± 0.10[b]	0.91 ± 0.19[b]

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Escin组比较，P<0.05

表5 KHOS-240S骨肉瘤细胞各组Nrf-2、HO-1、GPX4、4-HNE蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	Nrf-2	Ho-1	GPX4	4-HNE
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Erastin组	0.34 ± 0.14	0.43 ± 0.10	0.31 ± 0.16	3.10 ± 0.63
Escin组	0.35 ± 0.09[a]	0.47 ± 0.12[a]	0.33 ± 0.08[a]	2.57 ± 0.48[a]
Escin+Fer-1组	0.87 ± 0.10[b]	0.79 ± 0.08[b]	0.70 ± 0.03[b]	1.35 ± 0.21[b]

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Escin组比较，P<0.05

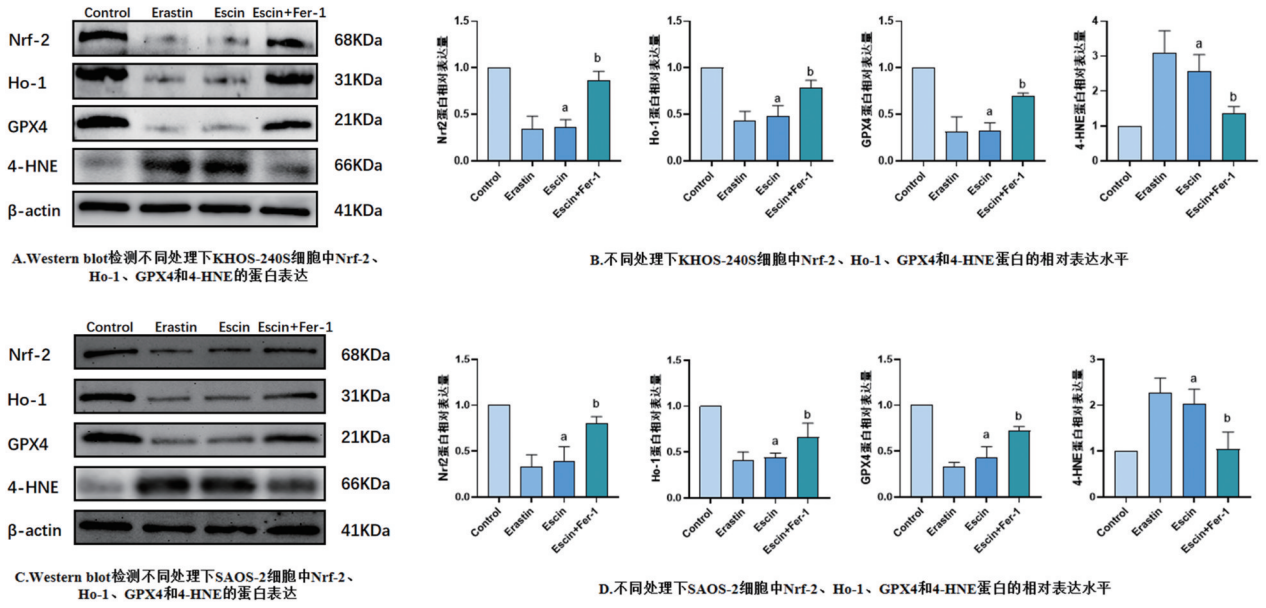
表6 SAOS-2骨肉瘤细胞各组Nrf-2、HO-1、GPX4、4-HNE蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	Nrf-2	Ho-1	GPX4	4-HNE
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Erastin组	0.33 ± 0.13	0.41 ± 0.09	0.33 ± 0.04	2.26 ± 0.33
Escin组	0.39 ± 0.15[a]	0.44 ± 0.05[a]	0.43 ± 0.12[a]	2.01 ± 0.33[a]
Escin+Fer-1组	0.80 ± 0.07[b]	0.66 ± 0.15[b]	0.72 ± 0.05[b]	1.04 ± 0.37[b]

注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Escin组比较，P<0.05

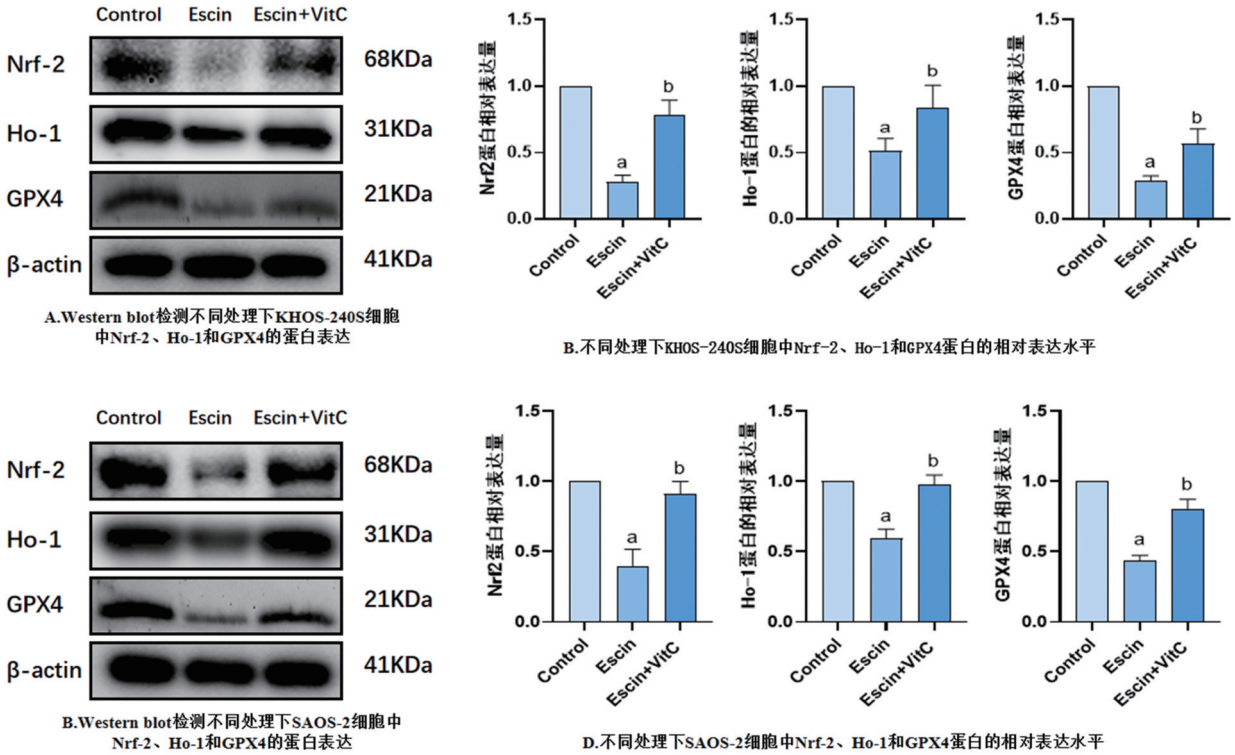
2.5 抗氧化剂维生素C可逆转七叶皂苷对Nrf2/HO-1/GPX4通路的抑制作用

为进一步验证Nrf2/HO-1/GPX4通路在七叶皂苷诱导铁死亡中的核心作用，采用抗氧化剂维生素C进行干预以激活Nrf2[15]。Western blot结果显示，七叶皂苷处理显著降低KHOS-240S细胞中Nrf2（F=192.78，P<0.001）、HO-1（F=103.16，P<0.001）及GPX4（F=1 150.29，P<0.001）的蛋白表达。而维生素C共处理可部分逆转七叶皂苷引起的Nrf2、HO-1和GPX4蛋白表达下调（F=94.50，P<0.001；F=22.46，P=0.005；F=33.89，P=0.002；图5A、5B，表7）。此外，在SAOS-2细胞中进行的实验进一步验证该结果（图5C、5D，表8）。该结果从反向角度证实，七叶皂苷诱导的氧化应激和铁死亡是通过抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号通路实现的。



注：a，与对照组比较，P<0.05；b，与Escin组比较，P<0.05（$\bar{x}\pm s$，n=3）

图4 qRT-PCR和Western blot法检测不同处理对骨肉瘤细胞中Nrf2/HO-1/ GPX4信号通路以及4-HNE基因及蛋白表达的影响



注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b：与Escin组比较，$P<0.05$（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

图5 Western blot法检测七叶皂苷和维生素C处理对骨肉瘤细胞中Nrf2/HO-1/GPX4信号通路蛋白表达的影响

表7 KHOS-240S骨肉瘤细胞各组Nrf-2、HO-1、GPX4蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Nrf-2	Ho-1	GPX4
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Escin组	0.28 ± 0.06[a]	0.51 ± 0.10[a]	0.28 ± 0.04[a]
Escin+VitC组	0.77 ± 0.09[b]	0.83 ± 0.17[b]	0.57 ± 0.11[b]

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与Escin组比较，$P<0.05$

表8 SAOS-2骨肉瘤细胞各组Nrf-2、HO-1、GPX4蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Nrf-2	Ho-1	GPX4
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Escin组	0.40±0.12[a]	0.56±0.08[a]	0.44±0.03[a]
Escin+VitC组	0.91±0.09[b]	0.96±0.02[b]	0.80±0.07[b]

注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与Escin组比较，$P<0.05$

3 讨 论

骨肉瘤是一种在青少年中高发的侵袭性骨肿瘤。尽管新辅助化疗联合保肢手术已使5年生存率提高至60%~78%，但转移性或耐药性OS患者的预后仍然较差[4,16]。目前的标准治疗方案包括多柔比星、甲氨蝶呤，以及联合顺铂和异环磷酰胺，虽然能够有效缩小原发灶，但仍面临两大临床挑战：其一，约20%的初诊患者已存在转移，且微小转移灶难以完全清除；其二，化疗抵抗性骨肉瘤即使接受当前可用的多学科综合治疗，其预后依然不佳，部分患者因化疗耐药而复发，显著增加死亡风险并降低生存质量[17]。近年来，靶向程序性细胞死亡成为突破OS治疗瓶颈的重要方向。最新研究表明，通过诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡，可以显著增强其对多柔比星、顺铂等化疗药物的敏感性，并有效改善治疗效果[18]。本研究发现七叶皂苷可通过抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号轴显著诱导OS细胞铁死亡，为中药活性成分重塑OS细胞命运提供了新的理论依据。

铁死亡是一种与细胞凋亡不同的程序性细胞死亡方式，其发生依赖于脂质过氧化和铁的积累。在铁死亡的发生与进展过程中，脂质过氧化起着关键作用，该过程主要包括ROS驱动的脂质过氧化降解，最终导致细胞损伤和膜破裂[19]。最新研究揭示，骨肉瘤与铁死亡存在密切关联，即铁死亡相关基因可通过调控免疫相关的信号通路及免疫微环境来影响骨肉瘤的发展与预后[20]。研究还发现，抗骨质疏松经典药物唑来膦酸可通过靶向细胞色素P450氧化还原酶（cytochrome P450 oxidoreductase，POR）提高活性氧水平并诱导细胞铁死亡，进而抑制骨肉瘤进展[21-22]。与唑来膦酸及传统铁死亡诱导剂（如

Erastin)的单一靶点作用不同,七叶皂苷可同步抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 三级通路,体现中药'多靶点协同'优势。

细胞铁死亡的调控主要与胱氨酸/谷氨酸逆转运体(System Xc^-)和GPX4的表达和活性密切相关。其中,System Xc^-关键亚基SLC7A11负责将胱氨酸转运至细胞内,还原为半胱氨酸以合成谷胱甘肽(glutathione,GSH);而GPX4可将脂质氢过氧化物转化为脂质醇类化合物,从而阻断铁依赖性毒性ROS形成[23-24]。此外,作为一种重要的非酶抗氧化剂,谷胱甘肽不仅具有自由基清除功能,还可作为GPX4介导的脂质氢过氧化物还原反应的辅助因子[24]。因此,抑制SLC7A11、GPX4的表达和活性可以触发铁死亡,而激活并促进SLC7A11、GPX4的表达有助于抑制铁死亡。本研究首次阐明七叶皂苷通过以下机制调控骨肉瘤细胞的铁死亡过程:首先,七叶皂苷显著提升OS细胞中的ROS水平,这一效应能够被铁死亡抑制剂Fer-1特异性逆转,从而验证了其诱导铁死亡的能力。其次,七叶皂苷通过靶向抑制GPX4通路发挥作用。Western blot结果表明,七叶皂苷显著降低GPX4蛋白表达水平,且其效果与已知铁死亡诱导剂Erastin相当。此外,Fer-1干预可部分恢复GPX4的表达,进一步提示GPX4是七叶皂苷诱导铁死亡的关键靶点。

Nrf2/HO-1信号通路在抗氧化应激中发挥重要作用,并在维持细胞氧化还原平衡方面起到关键作用。研究表明,Nrf2不仅具有细胞保护功能,还可调控多种抗氧化、抗炎和解毒蛋白编码基因的表达。其中,HO-1作为Nrf2的重要下游靶点,通过上调其表达及促进血红素分解代谢产物来实现抗氧化和抗炎效应。研究发现,抑制Nrf2/HO-1信号通路能够促进细胞铁死亡,而激活该通路则可抑制细胞铁死亡[25-26]。相关研究表明,激活Nrf2可显著上调HO-1和GPX4的表达,从而有效减轻氧化应激并保护线粒体完整性,防止线粒体功能障碍[19]。相反,抑制Nrf2/HO-1信号通路会介导骨肉瘤细胞氧化损伤并诱导自噬性死亡[27]。本研究结果表明,七叶皂苷与Erastin不仅能显著抑制GPX4的表达,还能有效抑制Nrf2和HO-1的表达。进一步研究发现,七叶皂苷介导的Nrf2/HO-1/GPX4信号通路抑制效应可被Fer-1和抗氧化剂维生素C逆转[15]。因此,七叶皂苷能够同步下调Nrf2、HO-1及GPX4的基因和蛋白表达,形成信号轴级联抑制效应,较传统单靶点抑制剂具有更显著的氧化应激放大效应。本研究将中药活性成分与经典抗氧化通路有机结合,首次证实娑罗子提取物通过抑制Nrf2介导的抗氧化反应("解毒"),进而促进铁死亡("攻邪"),体现了中医药"扶正祛邪"理论的现代科学内涵,为中西医机制的深度融合提供了有力支持。

综上所述,本研究首次证实了七叶皂苷对骨肉瘤细胞铁死亡的诱导作用,并初步揭示其可能通过抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号通路发挥抗骨肉瘤作用。因此,七叶皂苷有望作为一种潜在的中药成分用于骨肉瘤的治疗。本研究阐明了七叶皂苷诱导骨肉瘤细胞铁死亡的分子机制,并明确了Nrf2/HO-1/GPX4轴在七叶皂苷抗骨肉瘤中的重要调控作用。然而,本研究仍存在以下局限性:首先,尚未通过动物模型验证七叶皂苷在体内的抗骨肉瘤效果;其次,缺乏基于转录组学、代谢组学等多组学的全网络调控机制解析。未来研究可通过构建原位骨肉瘤小鼠模型,结合测序技术深入解析七叶皂苷对肿瘤微环境的调控作用,进一步完善其作用机制。并且七叶皂苷在体内的骨组织靶向性较差,未来可通过纳米载体修饰提高骨组织靶向性以实现骨肉瘤治疗。此外,鉴于七叶皂苷与临床化疗药的协同作用[10],未来可探索七叶皂苷与临床化疗药的协同效应,并验证其能否通过Nrf2轴逆转化疗耐药。通过上述改进可提高实验结果的科学性和可靠性,为骨肉瘤的临床防治提供新策略和理论依据。

利益冲突:所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明:陈带领:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;袁芳:数据收集、论文撰写;陈长军:研究方案设计、实验技术指导和资金支持、分析数据、论文修改;唐甜甜:数据收集、分析数据;应振栋:数据收集、分析数据;王秋入:分析数据;董素淼:数据收集;张磊:研究方案设计,实验技术指导并提供技术和资金支持;

参 考 文 献

[1] Chen CJ, Yin JF, Zhang HX, et al. Proximal femoral metastasis from epidermal growth factor receptor-mutated lung adenocarcinoma mimicking osteosarcoma on magnetic resonance imaging[J]. World J Oncol, 2024, 15(4): 731-735.

[2] 岳小涵,康 权,石雨鹭,等. 过表达SIRT4对骨肉瘤细胞恶性生物学行为及能量代谢的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2024, 49(8): 949-958.
Yue XH, Kang Q, Shi YL, et al. Effect of Sirtuin 4 overexpression on malignant biological behavior and energy metabolism of osteosarcoma cells [J]. J Chongqing Med Univ, 2024, 49(8): 949-958.

[3] Shoaib Z, Fan TM, Irudayaraj JMK. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets[J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(2): 201-217.

[4] Jafari F, Javdansirat S, Sanaie S, et al. Osteosarcoma: A comprehensive review of management and treatment strategies[J]. Ann Diagn Pathol, 2020, 49: 151654.

[5] Liu X, Du SW, Wang SD, et al. Ferroptosis in osteosarcoma: A

promising future[J]. Front Oncol,2022,12:1031779.

[6] Sun SM, Shen J, Jiang JW, et al. Targeting ferroptosis opens new avenues for the development of novel therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther,2023,8(1):372.

[7] Baruah P, Moorthy H, Ramesh M, et al. A natural polyphenol activates and enhances GPX4 to mitigate amyloid-β induced ferroptosis in Alzheimer's disease[J]. Chem Sci,2023,14(35):9427-9438.

[8] Zhang YN, Shen GH, Meng TT, et al. Eicosapentaenoic acid enhances the sensitivity of osteosarcoma to cisplatin by inducing ferroptosis through the DNA-PKcs/AKT/NRF2 pathway and reducing PD-L1 expression to attenuate immune evasion[J]. Int Immunopharmacol, 2023,125(Pt B):111181.

[9] 陈长军,徐为华,张梦晨,等.七叶皂苷药理活性及制剂临床应用研究进展[J].武汉大学学报(医学版),2020,41(1):157-163.

Chen CJ,Xu WH,Zhang MC,et al. Research progress on the escin pharmacological activity and clinical application of its preparation[J]. Med J Wuhan Univ,2020,41(1):157-163.

[10] Li CY, He ZQ, Yao F, et al. Role of Escin in breast cancer therapy:potential mechanism for inducing ferroptosis and synergistic antitumor activity with cisplatin[J]. Apoptosis,2023,28(7/8):1154-1167.

[11] Zhu J, Yu W, Liu B, et al. Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Death Dis, 2017,8(10):e3113.

[12] 马小杰,张贵慧,李润泽,等.对硒代甲硫氨酸逆转糖皮质激素介导的成骨细胞凋亡和成骨阻抑治疗大鼠激素性股骨头坏死的机制探索[J/OL].中华损伤与修复杂志(电子版),2025,20(5):412-420.

Ma XJ,Zhang GH,Li RZ,et al. Mechanistic exploration of Selenomethionine in reversing glucocorticoid-mediated osteoblast apoptosis and osteogenesis inhibition for treating glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats[J/OL]. Chin J Inj Repair Wound Heal Electron Ed,2025,20(5):412-420.

[13] 应振栋,王 鹏,张 磊,等.4-甲基儿茶酚胺抑制成纤维样滑膜细胞迁移和炎症反应治疗类风湿关节炎的机制研究[J].中国修复重建外科杂志,2025,39(8):1051-1060.

Ying ZD,Wang P,Zhang L,et al. Mechanism of 4-methylcatechol in inhibiting fibroblast-like synoviocyte migration and suppressing inflammatory responses in treatment of rheumatoid arthritis[J]. Chin J Reparative Reconstr Surg,2025,39(8):1051-1060.

[14] 应振栋,陈长军,陈带领,et al.高剂量糖皮质激素对骨髓间充质干细胞衰老、凋亡和成骨分化的影响及机制[J].中华骨科杂志.2025,45(18):1208-1216.

Ying ZD, Chen CJ,Chen DL, et al. Effects and mechanisms of high-dose glucocorticoids on senescence, apoptosis, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chinese Journal of Orthopaedics.2025,45(18):1208-1216.

[15] Fatima S, Alrashoudi RH, Alqarni SS, et al. Vitamin C ameliorates potassium dichromate-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction *via* PGC-1α/nrf-2/TFAM pathway[J]. J Biochem Mol Toxicol,2025,39(1):e70061.

[16] Brown JM, Steffensen A, Trump B. Clinical features and overall survival of osteosarcoma of the mandible[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2023,52(5):524-530.

[17] Zhou X, Wu JL, Duan CG, et al. Retrospective analysis of adoptive TIL therapy plus anti-PD1 therapy in patients with chemotherapy-resistant metastatic osteosarcoma[J]. J Immunol Res, 2020, 2020: 7890985.

[18] He MY, Wang Y, Xie JJ, et al. M(7)G modification of FTH1 and pri-miR-26a regulates ferroptosis and chemotherapy resistance in osteosarcoma[J]. Oncogene,2024,43(5):341-353.

[19] Yang RY, Gao WH, Wang ZB, et al. Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction *via* Nrf2/HO-1/GPX4 axis[J]. Phytomedicine,2024,122:155135.

[20] Lei T, Qian H, Lei PF, et al. Ferroptosis-related gene signature associates with immunity and predicts prognosis accurately in patients with osteosarcoma[J]. Cancer Sci,2021,112(11):4785-4798.

[21] Hong JC, Yang QR, Li HN, et al. Zoledronic acid induces ferroptosis by upregulating POR in osteosarcoma[J]. Med Oncol, 2023, 40 (5):141.

[22] 陈长军,王秋入,赵 鑫,等.骨质疏松症的发病机制及临床药物治疗研究进展[J].重庆医科大学学报,2024,49(10):1031-1038.

Chen CJ, Wang QR, Zhao X, et al. Research advances in the pathogenesis and clinical drug treatment of osteoporosis[J]. J Chongqing Med Univ,2024,49(10):1031-1038.

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

[24] Luo Y, Gao X, Zou LT, et al. Bavachin induces ferroptosis through the STAT3/P53/SLC7A11 axis in osteosarcoma cells[J]. Oxid Med Cell Longev,2021,2021:1783485.

[25] Yang JW, Mo JJ, Dai JJ, et al. Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling pathway in KRAS mutant colorectal cancer[J]. Cell Death Dis,2021,12(11):1079.

[26] Yang WC, Wang YX, Zhang CG, et al. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation[J]. Front Pharmacol,2022,13:865689.

[27] 王琪琪,林 巧,单微燕,等.岩藻多糖诱导人骨肉瘤细胞143B损伤作用及其机制[J].中国应用生理学杂志,2022,38(6):739-744.

Wang QQ, Lin Q, Shan WY, et al. Effects of fucoidan inducing impairment of human osteosarcoma cell 143B and its mechanism[J]. Chin J Appl Physiol,2022,38(6):739-744.

(**收稿**:2025-10-17;**修回**:2025-11-19;**录用**:2025-12-26)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

陈带领,袁芳,陈长军,等.七叶皂苷抑制Nrf2/HO-1/GPX4信号通路促进骨肉瘤细胞铁死亡的机制研究[J].重庆医科大学学报,XXXX,XX(XX):1-9.