

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2026.06.016

论著·基础

三七皂苷 Ft1 通过激活 Nrf2/HO-1/GPX4 通路诱导肝癌细胞铁死亡的作用机制研究

孙姘 李芳兰 商洋洋 郑百战 孙英 王轲



基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划(2022SF-314)

作者单位: 712000 陕西咸阳 延安大学咸阳医院消化内科一病区

通信作者: 王轲 ,E-mail: 635292258@qq.com

【摘要】 目的 探讨三七皂苷 Ft1 (NFt1) 调控 Nrf2/HO-1/GPX4 通路诱导铁死亡抑制肝细胞癌(HCC) 进展的可能机制。方法 2024 年 8 月—2025 年 8 月于延安大学咸阳医院进行实验,以人 HCC 细胞系 HepG2 为研究对象,用不同浓度的 NFt1(0、0.5、1、2、4、6、8、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 处理,CCK-8 法测定细胞活性。将 HepG2 细胞分为空白对照组、NFt1 低、中和高剂量(2、4、6 $\mu\text{mol/L}$) 组,Erastin(10 $\mu\text{mol/L}$) 组和 NFt1(6 $\mu\text{mol/L}$) + 核因子 E2 相关因子 2(Fer-1)(1 $\mu\text{mol/L}$) 组,共 6 组。采用集落形成实验、划痕实验和 Transwell 实验检测细胞增殖、迁移和侵袭能力;FerroOrange 荧光探针检测 Fe^{2+} 含量;DCFH-DA 荧光探针检测氧化应激;试剂盒检测 MDA 和 GSH 水平;Western-blot 检测铁死亡和 Nrf2/HO-1/GPX4 通路相关蛋白表达;免疫荧光检测 Nrf2 亚细胞定位和表达情况;JC-1 荧光探针评估线粒体膜电位;透射电子显微镜检测线粒体超微结构。结果 NFt1 可显著抑制 HepG2 细胞的存活率,具有时间和浓度依赖性($P < 0.05$)。与空白对照组比较,NFt1 低、中和高剂量组 HepG2 细胞集落形成数、迁移率和侵袭率均降低,相对 FerroOrange 荧光强度、平均 ROS 荧光强度和 MDA 水平逐渐升高,GSH 水平、Nrf2、HO-1、GPX4 和 xCT 蛋白表达、核 Nrf2 平均荧光强度逐渐降低,均呈浓度依赖性($P < 0.05$);NFt1 高剂量组和 Erastin 组 HepG2 细胞中多聚体 JC-1/单体 JC-1 荧光比值降低,表现出线粒体体积减小、双层膜密度增加、线粒体嵴减少及线粒体外膜破裂($P < 0.05$)。与 NFt1 高剂量组比较,NFt1+Fer-1 组 HepG2 细胞中多聚体 JC-1/单体 JC-1 荧光比值升高,线粒体损伤特征得到逆转($P < 0.05$)。而 NFt1 高剂量组与 Erastin 组 HepG2 细胞之间以上指标比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 NFt1 可能通过抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 通路激活,诱导 HCC 细胞发生铁死亡,这一过程可能与线粒体结构和功能的损伤密切相关。

【关键词】 肝细胞癌;三七皂苷 Ft1;Nrf2/HO-1/GPX4 通路;铁死亡;线粒体;作用机制**【中图分类号】** R735.7 **【文献标识码】** A

Study on the mechanism of ferroptosis induced by Notoginsenoside Ft1 in hepatoma cells via activation of the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway Sun Hua ,Li Fanglan ,Shang Yangyang ,Zheng Baizhan ,Sun Ying ,Wang Ke. Department of Gastroenterology ,Xianyang Hospital of Yan'an University ,Shaanxi ,Xianyang 712000 ,China

Funding program: Shaanxi Science and Technology Research and Development Plan (2022SF-314)

Corresponding author: Wang Ke ,E-mail: 635292258@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanism by which notoginsenoside Ft1 (NFt1) regulates the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway to induce ferroptosis and inhibit the progression of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Human HCC cell line HepG2 was treated with different concentrations of NFt1 (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$), and cell viability was determined by CCK-8 assay. HepG2 cells were divided into six groups: control group; low-, medium-, and high-dose NFt1 groups (2, 4, and 6 $\mu\text{mol/L}$); Erastin group (10 $\mu\text{mol/L}$); and NFt1 (6 $\mu\text{mol/L}$) + Fer-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) group. Colony formation assay, scratch assay, and Transwell assay were used to detect cell proliferation, migration, and invasion. A FerroOrange fluorescent probe was used to detect Fe^{2+} content. The dCFH-DA fluorescent probe was used to detect oxidative stress. MDA and GSH levels were detected by commercial kits. Western blot was used to detect ferroptosis-related proteins and Nrf2/HO-1/GPX4 pathway-related protein expression. Subcellular localization and expression of Nrf2 were detected by immunofluorescence. JC-1 fluorescent probe was used to evaluate mitochondrial membrane potential. Mitochondrial ultrastructure was detected by transmission electron microscopy. **Results** NFt1 significantly inhibited the viability of HepG2 cells in a time- and concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the number of colonies formed, migration

rate, and invasion rate of HepG2 cells in the Nrf1 low-, medium-, and high-dose groups were decreased. Relative FerroOrange fluorescence intensity, average ROS fluorescence intensity, and MDA levels gradually increased, while GSH levels, Nrf2, HO-1, GPX4, and xCT protein expression, and nuclear Nrf2 average fluorescence intensity gradually decreased in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). The fluorescence ratio of JC-1 polymer/monomer in HepG2 cells in the high-dose Nrf1 group and Erastin group decreased, showing decreased mitochondrial volume, increased double-layer membrane density, decreased mitochondrial cristae, and mitochondrial outer membrane rupture (all $P < 0.05$). Compared with the high-dose Nrf1 group, the JC-1 polymer/monomer fluorescence ratio in HepG2 cells in the Nrf1 + Fer-1 group increased, and the mitochondrial damage characteristics were reversed ($P < 0.05$). There was no significant difference in the above indicators between the high-dose Nrf1 group and the Erastin group ($P > 0.05$). **Conclusion** Nrf1 may induce ferroptosis in HCC cells by inhibiting the activation of the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway, which may be closely related to the damage of mitochondrial structure and function.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Notoginsenoside Ft1; Nrf2/HO-1/GPX4 pathway; Ferroptosis; Mitochondria; Mechanism

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球癌症相关死亡的主要原因之一,晚期患者治疗选择有限且预后较差^[1]。尽管近年来 HCC 治疗策略取得一定进展,但仍亟需开发更有效且具有靶向性的治疗方案^[2]。天然产物,尤其是传统中草药提取物,因其多样化的药理作用及潜在的抗癌活性而受到广泛关注^[3]。三七作为传统中药,其主要活性成分之一——三七皂苷 Ft1(notoginsenoside Ft1, Nrf1)在多种癌症模型中已显示出显著的抗肿瘤活性,但其在 HCC 中的作用尚有研究报道^[4-6]。铁死亡是一种新近发现的铁依赖性程序性细胞死亡方式,诱导铁死亡为肿瘤治疗提供了新思路^[7]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是抗氧化防御系统的核心调控因子,通过激活下游谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)等基因,参与调控铁稳态、脂质代谢及谷胱甘肽合成,从而在铁死亡过程中发挥重要调节作用^[8]。已有研究提示,三七可通过激活 Nrf2 抑制铁死亡^[9]。然而 Nrf1 是否通过调控 Nrf2/HO-1/GPX4 通路介导铁死亡从而抑制 HCC 进展,目前尚未明确。本研究旨在探讨 Nrf1 对 HCC 细胞铁死亡的影响及其潜在机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 实验细胞: HepG2 人肝癌细胞购于武汉赛尔生物医疗科技有限公司。(2) 试剂与试剂: Nrf1、铁抑素-1(ferrostatin-1, Fer-1)、爱拉斯汀(Erastin)和 Nrf2 抑制剂 ML-385(美国 MCE 公司,货号: HY-N10594、HY-I00579、HY-I5762、HY-I00523); GPX4 多克隆抗体、溶质载体家族 7 成员 11/胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白多克隆抗体(solute carrier family 7 member 11/cystine-glutamate antiporter polyclonal antibody, SLC7A11/xCT)多克隆抗体、Nrf2 重组抗体、

HO-1 单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号: 17754-1-AP、26864-1-AP、66535-1-Ig、66741-1-Ig)。(3) 试剂盒: 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、BCA 蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号: C0037、S0131、S0033、C2006、P0010); 还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号: BC1175); FerroOrange(Fe^{2+} 荧光探针)(上海懋康生物科技有限公司,货号: MKB0089)。(4) 仪器设备: CO_2 培养箱(型号: CLM-170B-8-CN, 新加坡 Esco 公司); 倒置荧光显微镜(型号: MHIF3000, 广州明慧科技有限公司); 酶标仪(型号: GEN5 IPRIME, 美国 Agilent 公司); 高速冷冻离心机(型号: iCEN-24R, 杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 实验方法 于 2024 年 8 月—2025 年 8 月在延安大学咸阳医院进行实验。取对数生长期的 HepG2 细胞均匀接种至细胞培养皿,细胞复苏后,接种至添加 10% 胎牛血清(FBS)及 1% 双抗(青霉素/链霉素)的 RPMI-1640 培养基中,于 37℃、5% CO_2 培养箱进行常规培养。待细胞扩增至对数生长期后分组: 空白对照组, Nrf1 低、中和高剂量(2、4 和 6 $\mu\text{mol/L}$)组, Erastin(10 $\mu\text{mol/L}$)组和 Nrf1(6 $\mu\text{mol/L}$) + Fer-1(1 $\mu\text{mol/L}$)组,共 6 组。分别给予相应剂量药物和试剂处理 24 h 后进行后续实验。

1.2.1 CCK-8 法测定细胞活性: HepG2 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后,收集对数期细胞悬液,按每孔 5×10^3 个细胞的密度铺板至 96 孔板。细胞完全贴壁后,分别施加梯度浓度 Nrf1(0、0.5、1、2、4、6、8、10、20 $\mu\text{mol/L}$)干预,于 37℃、5% CO_2 条件下分别培养 24 h、48 h。弃去原培养基,每孔添加 CCK-8 试剂 10 μl ,维持 37℃ 孵育 30 min。使用酶标仪测定 450 nm 波长吸光度值

(OD) 按公式计算: 细胞存活率(%) = (实验组 OD 值/空白对照组 OD 值) × 100%。通过 GraphPad Prism 9.0 软件分析获得药物半数抑制浓度(IC₅₀) ,其值越低表明抑制效力越强。

1.2.2 集落形成实验检测细胞增殖: 将对数生长期的 HepG2 细胞均匀接种于 6 孔板(1×10³ 个/孔) ,培养 12 h 后 ,用含 10% FBS 的培养基替换上清液 ,在 37℃ 细胞培养箱中孵育 1 周。弃去培养基 ,PBS 清洗 ,4% 多聚甲醛固定 30 min ,0.2% 结晶紫染色 30 min ,清洗后光学显微镜下拍照并统计各组集落数。

1.2.3 细胞迁移划痕实验检测细胞迁移: 将处理后的 HepG2 细胞接种至 6 孔板 ,待细胞融合率达 90% 时 ,使用无菌枪头垂直于孔板轻划直线伤口。继续培养 48 h 后 ,于 0、24、48 h 时间点采用显微成像系统采集划痕区域图像。通过 Image J 软件量化划痕闭合率: 迁移率(%) = [(初始划痕面积-终止划痕面积) / 初始划痕面积] × 100%。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭: 采用 Matrigel 基底基质包被的 Transwell 小室评估侵袭能力。将 1.5×10⁴ 个 HepG2 细胞(各组) 重悬于无血清培养基 ,接种至预铺 Matrigel 基质胶(4℃ 预凝) 的上室; 下室加入 600 μl 含 10% FBS 的完全培养基; 培养 48 h 后取出上室 ,PBS 清洗去除未侵袭细胞 ,4% 多聚甲醛固定 15 min ,结晶紫染色 10 min; 光学显微镜下随机选取视野计数穿过基底膜的细胞。

1.2.5 FerroOrange 荧光探针检测 Fe²⁺ 含量: 将处于对数生长期的各组 HepG2 细胞以 1×10⁵ /ml 个细胞的密度接种于 12 孔板中 ,培养至约 60% 融合度。随后 ,处理细胞 24 h。去除原培养基后 ,用无血清培养基冲洗细胞 2 次。将 1 μmol/L 的 FerroOrange 荧光探针工作液(在无血清培养基中配制) 加入细胞。置于 37℃ 黑暗环境中孵育 30 min。观察细胞并使用荧光显微镜获取图像。使用 Image J 软件对 FerroOrange 的荧光强度进行定量。

1.2.6 DCFH-DA 荧光探针检测氧化应激: 将各组 HepG2 细胞按 5×10⁴ 个/孔密度铺板于 6 孔板。细胞贴壁后分别加入对应浓度的干预药物处理 24 h ,PBS 漂洗 3 次 ,避光条件下与 10 μmol/L DCFH-DA 探针(37℃) 共孵育 20 min。终止染色后 ,通过荧光显微镜采集细胞内 ROS 荧光信号 ,采用 Image J 软件定量分析活性氧水平。

1.2.7 MDA 和 GSH 水平测定: 将各组 HepG2 细胞以每孔 5×10⁴ 个细胞的密度接种于 6 孔板中 ,细胞贴壁后 ,处理 24 h。根据相应检测试剂盒说明书进行 MDA

和 GSH 含量检测。

1.2.8 Western-blot 检测铁死亡和 Nrf2/HO-1/GPX4 通路相关蛋白表达: 收集各组 HepG2 细胞 ,利用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将样本在 100℃ 的沸水浴中加热 10 min ,然后冷却备用。制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶 ,进行 SDS-PAGE 电泳 ,采用湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h ,然后在 4℃ 下与一抗 [抗 xCT(1:5 000)、抗 GPX4(1:5 000)、抗 Nrf2(1:1 000)、抗 HO-1(1:1 000) 和抗 β-actin(1:5 000)] 孵育过夜。次日 ,膜用 TBST 洗涤 3 次(每次 10 min) ,然后与 HRP 标记的二抗(1:5 000) 孵育 1 h。之后再用 TBST 洗涤 3 次 ,并利用 ECL 检测系统通过化学发光进行显色。最后 ,使用 Image J 软件定量分析相对蛋白表达水平。

1.2.9 免疫荧光检测 Nrf2 亚细胞定位和表达情况: 将 HepG2 细胞以每孔 1×10⁴ 个的密度接种于 24 孔板 ,细胞贴壁后 ,各组处理 24 h。将含细胞的盖片用 PBS 冲洗 3 次 ,然后用 4% 多聚甲醛固定 15 min ,随后用 0.25% TritonX-100 通透细胞 3 min ,再用 PBS 冲洗 ,室温下用 1% BSA 封闭 30 min ,随后在 4℃ 下与抗 Nrf2(1:200) 一抗共孵育过夜。用 PBST 缓冲液冲洗后 ,次日 ,在室温下与二抗共孵育 1 h。PBS 冲洗 3 次 ,加入 DAPI 染色细胞核。在室温下避光孵育 3~5 min 后 ,取出盖片 ,用荧光淬灭封片剂封片 ,使用荧光显微镜拍摄图像。

1.2.10 JC-1 荧光探针评估线粒体膜电位: 取对数期 HepG2 细胞经 24 h 处理后 ,收集培养上清 ,PBS 清洗细胞 2 次。加入 1 mg JC-1 染色工作液重悬细胞 ,37℃ 避光孵育 20 min。JC-1 缓冲液洗涤 2 次 ,新鲜培养基重悬细胞 ,荧光显微镜下进行线粒体膜电位成像分析。

1.2.11 透射电子显微镜检测线粒体超微结构: 将各组 HepG2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化 ,并在 2.5% 戊二醛溶液中固定 12 h。固定后 ,样本用 1% 水溶性四氧化锇后固定 ,依次用 30%~100% 的乙醇溶液和丙酮脱水 ,环氧树脂包埋 ,在 60℃ 下孵育 48 h ,以形成树脂块。使用超薄切片机进行 60~80 nm 切片 ,安装在 150 目铜网格上 ,使用透射电子显微镜观察和捕获图像。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,2 组间比较采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA) 。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nf1 对 HepG2 细胞活性的影响 以 0、0.5、1、2、

4、6、8、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 NFt1 分别处理 HepG2 细胞 24 或 48 h 后 细胞存活率均明显被抑制 ,呈时间和浓度依赖性 差异有统计学意义 ($F/P=136.825/<0.001$, $168.357/<0.001$) ,半数抑制率 IC_{50} 值分别为 $6.22 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.91 \mu\text{mol/L}$ 。因此 ,使用浓度为 2、4 和 $6 \mu\text{mol/L}$ 的 NFt1 进行后续研究 ,见表 1。

2.2 NFt1 对 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭的影响
与空白对照组比较 ,NFt1 低、中和高剂量组 HepG2 细胞集落形成数、迁移率和侵袭率均降低 ,呈浓度依赖性

($t/P_{\text{集落形成数}}=8.144/0.001$, $17.439/<0.001$, $29.863/<0.001$; $t/P_{24\text{ h迁移率}}=8.097/0.001$, $10.516/<0.001$, $21.367/<0.001$; $t/P_{48\text{ h迁移率}}=7.399/0.002$, $10.917/<0.001$, $14.697/<0.001$; $t/P_{\text{侵袭率}}=23.205/<0.001$, $30.302/<0.001$, $32.402/<0.001$)。而 NFt1 高剂量组与 Erastin 组 HepG2 细胞之间集落形成数、迁移率和侵袭率比较 ,差异无统计学意义 ($t/P_{\text{集落形成数}}=1.201/0.296$; $t/P_{24\text{ h迁移率}}=2.237/0.089$; $t/P_{48\text{ h迁移率}}=1.551/0.196$; $t/P_{\text{侵袭率}}=0.585/0.590$) ,见图 1、表 2。

表 1 不同浓度和时间的 NFt1 处理后 HepG2 细胞存活率 ($\bar{x}\pm s$,%)

Tab.1 Survival rate of HepG2 cells treated with different concentrations of NFt1 for different times

时间	NFt1 浓度($\mu\text{mol/L}$)										F 值	P 值
	0	0.5	1	2	4	6	8	10	20			
24 h	99.28 \pm 1.62	88.36 \pm 1.11	75.33 \pm 1.17	62.18 \pm 1.33	44.65 \pm 1.48	35.47 \pm 1.48	31.44 \pm 0.97	30.23 \pm 0.78	17.83 \pm 0.98	136.825	<0.001	
48 h	100.37 \pm 1.52	77.35 \pm 1.78 ^a	66.87 \pm 1.94 ^a	48.74 \pm 1.21 ^a	38.76 \pm 1.45 ^a	31.29 \pm 1.23 ^a	27.36 \pm 0.94 ^a	18.36 \pm 1.11 ^a	14.35 \pm 0.67 ^a	168.357	<0.001	
t 值	1.262	9.531	6.667	12.922	6.083	4.831	5.893	9.793	6.037			
P 值	0.366	0.008	0.011	0.005	0.033	0.042	0.020	0.008	0.019			

注:与 24 h 比较 ,^a $P<0.05$ 。

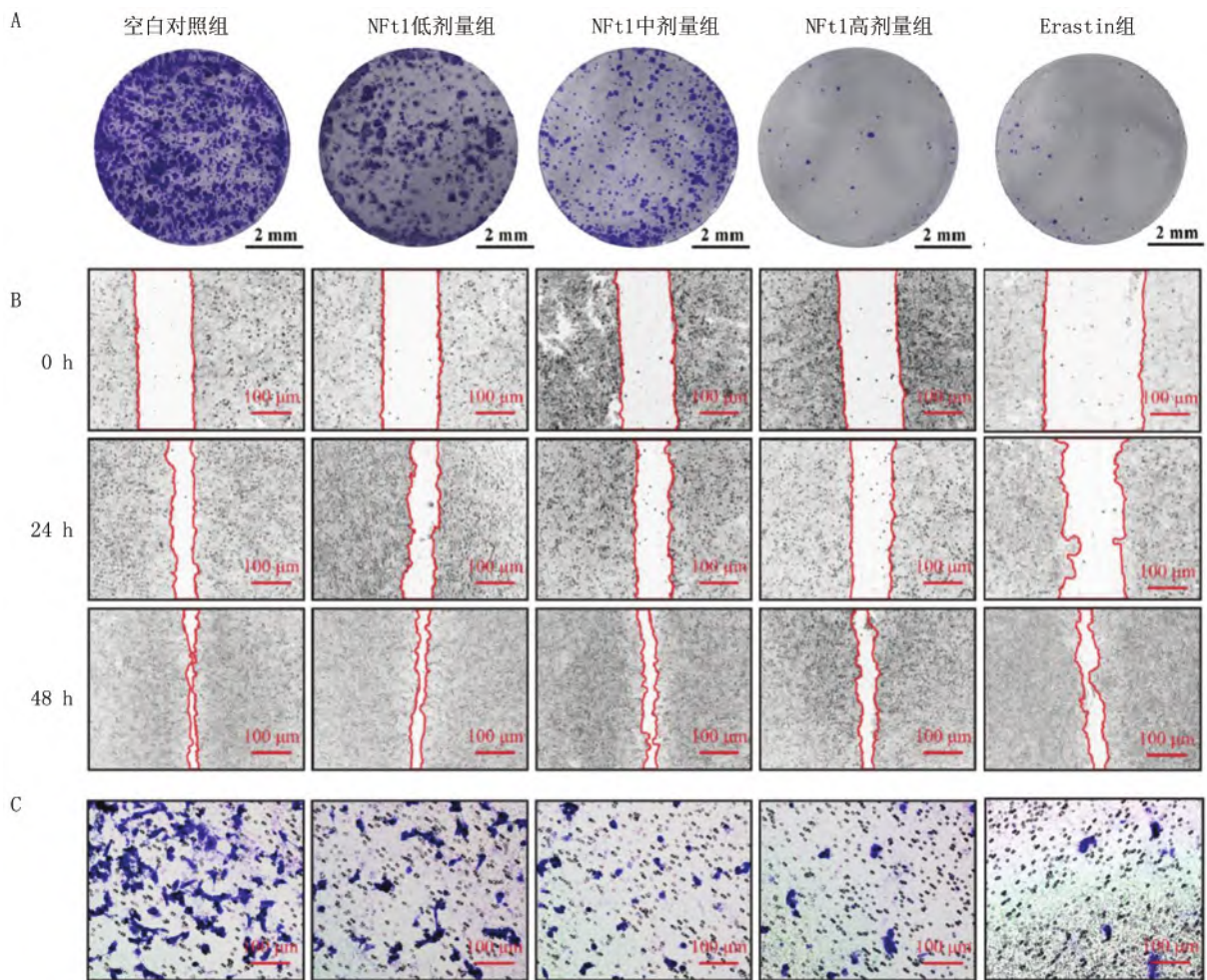


图 1 集落形成实验(A $\times 10$)、划痕实验(B $\times 200$)和 Transwell 实验(C $\times 200$)检测各组细胞增殖、迁移和侵袭

Fig.1 Colony formation assay (A $\times 10$) ,scratch assay (B $\times 200$) ,and Transwell assay (C $\times 200$) were used to detect the proliferation , migration and invasion of cells in each group

表 2 各组 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of proliferation , migration and invasion levels of HepG2 cells in each group

组 别	集落形成数 (个)	迁移率(%)		侵袭率 (%)
		24 h	48 h	
空白对照组	513.26±27.36	100.06±3.17	100.35±2.53	100.36±3.42
NFt1 低剂量组	372.35±12.23 ^a	81.36±2.44 ^a	88.12±1.34 ^a	46.38±2.13 ^a
NFt1 中剂量组	192.35±16.35 ^a	68.45±4.13 ^a	83.36±0.93 ^a	33.62±1.69 ^a
NFt1 高剂量组	38.26±3.23 ^a	48.93±2.67 ^a	78.12±0.68 ^a	21.44±2.47 ^a
Erastin 组	35.26±2.88 ^a	44.37±2.31 ^a	77.38±0.47 ^a	20.37±1.98 ^a
F 值	296.352	178.453	126.385	215.647
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^aP<0.05。

2.3 NFt1 对 HepG2 细胞 Fe²⁺ 含量的影响 与空白对照组比较,NFt1 低、中和高剂量组 HepG2 细胞的相对 FerroOrange 荧光强度逐渐升高,呈浓度依赖性($t/P = 5.587/0.005, 7.941/0.001, 14.411/<0.001$)。而 NFt1 高剂量组与 Erastin 组 HepG2 细胞之间相对 FerroOrange 荧光强度比较,差异无统计学意义($t/P = 1.659/0.172$) ,见图 2、表 3。

2.4 NFt1 对 HepG2 细胞氧化应激的影响 与空白对照组比较,NFt1 低、中和高剂量组 HepG2 细胞的平均 ROS 荧光强度和 MDA 水平逐渐升高,GSH 水平逐渐降低,呈浓度依赖性($t/P_{\text{平均ROS荧光强度}} = 9.007/0.001, 21.804/<0.001, 32.666/<0.001, t/P_{\text{MDA}} = 7.730/0.002, 16.268/<0.001, 21.424/<0.001; t/P_{\text{GSH}} = 11.824/<$

0.001, 13.506/<0.001, 18.001/<0.001)。而 NFt1 高剂量组与 Erastin 组 HepG2 细胞之间平均 ROS 荧光强度、MDA 和 GSH 水平比较,差异无统计学意义($t/P_{\text{平均ROS荧光强度}} = 0.173/0.871; t/P_{\text{MDA}} = 2.204/0.092; t/P_{\text{GSH}} = 0.792/0.473$) ,见图 3、表 3。

表 3 各组 HepG2 细胞 Fe²⁺ 含量和 ROS、MDA、GSH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison of Fe²⁺ content , ROS , MDA and GSH levels of HepG2 cells in each group

组 别	相对 FerroOrange 荧光强度	平均 ROS 荧光强度	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	GSH ($\mu\text{mol}/\text{g}$)
空白对照组	1.02±0.13	0.73±0.04	2.13±0.32	148.73±5.33
NFt1 低剂量组	1.53±0.09 ^a	0.99±0.03 ^a	3.97±0.26 ^a	111.34±1.26 ^a
NFt1 中剂量组	1.93±0.15 ^a	1.61±0.05 ^a	7.24±0.44 ^a	100.05±3.25 ^a
NFt1 高剂量组	2.29±0.08 ^a	2.09±0.06 ^a	8.37±0.39 ^a	77.36±4.33 ^a
Erastin 组	2.11±0.17 ^a	2.08±0.08 ^a	9.09±0.41 ^a	74.29±5.13 ^a
F 值	189.643	203.576	246.832	198.745
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,^aP<0.05。

2.5 NFt1 对 HepG2 细胞铁死亡和 Nrf2/HO-1/GPX4 通路相关蛋白的影响 与空白对照组比较,NFt1 低、中和高剂量组 HepG2 细胞的 Nrf2、HO-1、GPX4 和 xCT 蛋白表达逐渐降低,呈浓度依赖性($t/P_{\text{Nrf2}} = 3.146/0.035, 7.709/<0.002, 16.267/<0.001; t/P_{\text{HO-1}} = 3.674/0.021, 5.628/0.005, 12.031/<0.001; t/P_{\text{GPX4}} = 13.880/<$

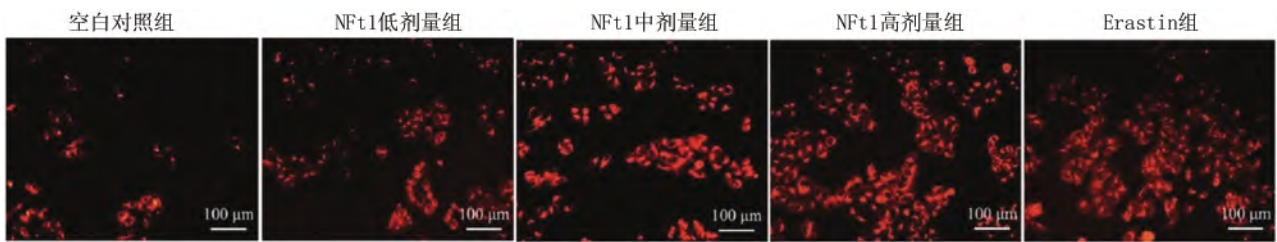


图 2 FerroOrange 荧光染色检测各组细胞 Fe²⁺ 含量(×200)

Fig.2 Detection of Fe²⁺ content in cells of each group by FerroOrange fluorescence staining

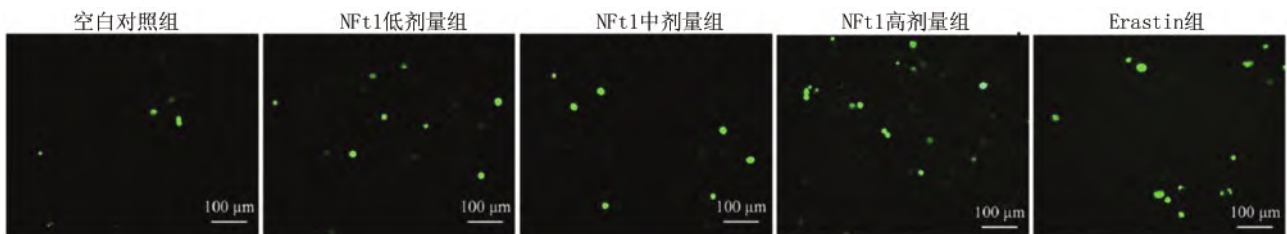


图 3 DCFH-DA 染色检测各组细胞 ROS 水平(×200)

Fig.3 Detection of ROS levels in cells of each group by DCFH-DA staining(×200)

0.001 ,19.053/<0.001 ,40.352/<0.001; $t/P_{xCT} = 9.738/0.001$,13.166/<0.001 ,12.031/<0.001)。而 NFt1 高剂量组与 Erastin 组 HepG2 细胞之间 Nrf2、HO-1、GPX4 和 xCT 蛋白表达水平比较 差异无统计学意义($t/P_{Nrf2} = 1.331/0.254$; $t/P_{HO-1} = 0.188/0.860$; $t/P_{GPX4} = 1.608/0.183$; $t/P_{xCT} = 1.504/0.207$) 见图 4、表 4。

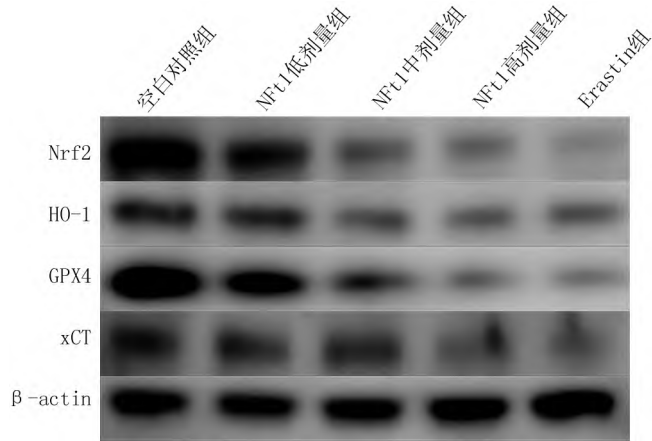


图 4 Western-blot 检测各组 HepG2 细胞铁死亡和 Nrf2/HO-1/GPX4 通路相关蛋白

Fig.4 Western-blot detection of ferroptosis and Nrf2/HO-1/GPX4 pathway-related proteins in HepG2 cells of each group

表 4 各组 HepG2 细胞铁死亡和 Nrf2/HO-1/GPX4 通路相关蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of ferroptosis and Nrf2/HO-1/GPX4 pathway-related protein expression levels of HepG2 cells in each group

组 别	Nrf2	HO-1	GPX4	xCT
空白对照组	1.62±0.10	0.79±0.04	1.16±0.03	1.14±0.04
NFt1 低剂量组	1.35±0.11 ^a	0.67±0.04 ^a	0.82±0.03 ^a	0.78±0.05 ^a
NFt1 中剂量组	0.89±0.13 ^a	0.47±0.09 ^a	0.61±0.04 ^a	0.71±0.04 ^a
NFt1 高剂量组	0.57±0.05 ^a	0.23±0.07 ^a	0.32±0.02 ^a	0.58±0.07 ^a
Erastin 组	0.51±0.06 ^a	0.24±0.06 ^a	0.27±0.05 ^a	0.51±0.04 ^a
F 值	176.352	158.473	196.582	142.635
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与空白对照组比较 ,^a $P < 0.05$ 。

2.6 NFt1 对 HepG2 细胞 Nrf2 核转位的影响 与空白对照组 [(71.35±1.72) AU]比较 ,NFt1 低、中和高剂量组 HepG2 细胞 Nrf2 平均荧光强度 [(65.17±1.25) AU、(58.16±1.31) AU、(48.57±2.35) AU]逐渐降低 ,呈浓度依赖性 ($t/P = 5.034/0.007$,10.567/<0.001 ,13.549/<0.001)。而 NFt1 高剂量组与 Erastin 组 [(45.37±2.53) AU]HepG2 细胞之间 Nrf2 平均荧光强度比较 ,差异无统计学意义($t/P = 1.605/0.184$) 见图 5。

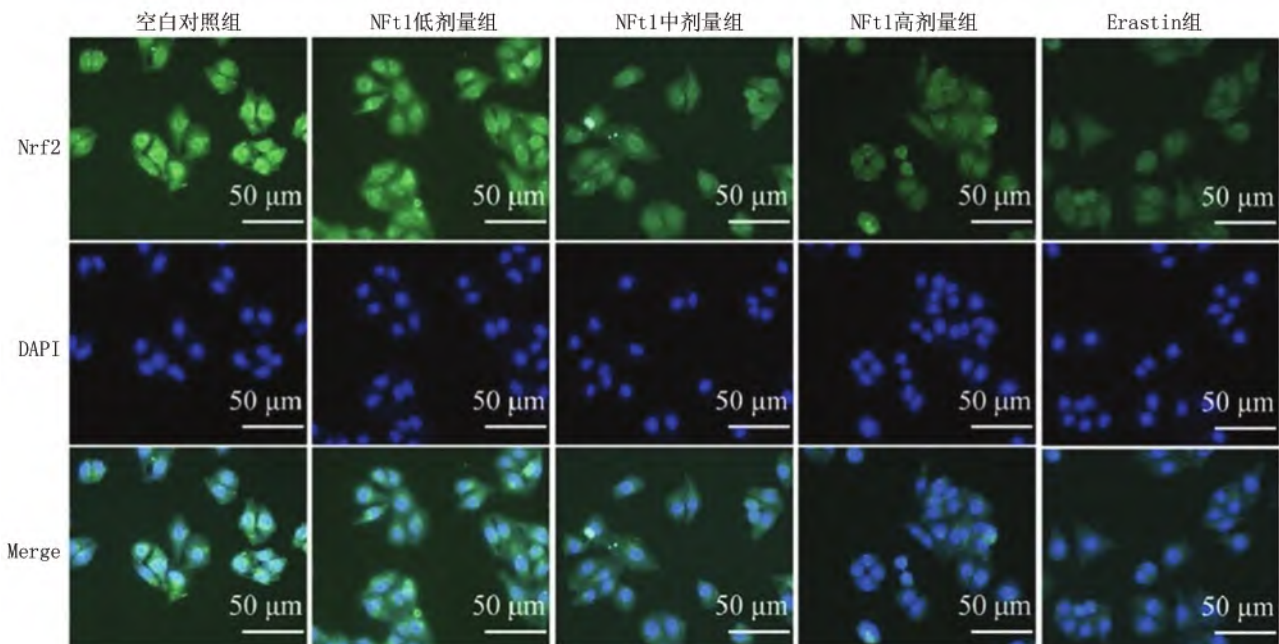


图 5 免疫荧光染色检测各组 HepG2 细胞 Nrf2 核转位情况(×100)

Fig.5 Detection of Nrf2 nuclear translocation in HepG2 cells of each group by immunofluorescence staining(×100)

2.7 NFt1 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 与空白对照组 (1.02 ± 0.07) 比较 ,NFt1 高剂量组 (0.42 ± 0.08) 和 Erastin 组 HepG2 细胞 (0.45 ± 0.04) 中多聚体 JC-1/单体 JC-1 荧光比值降低 ($t/P = 9.776/0.001$, $12.246/<0.001$) 。与 NFt1 高剂量组比较 ,NFt1 + Fer-1 组 (0.79 ± 0.04) HepG2 细胞中多聚体 JC-1/单体 JC-1 荧光比值升高 ($t/P = 7.165/0.002$) 。NFt1 高剂量组和 Erastin 组 HepG2 细胞之间多聚体 JC-1/单体 JC-1 荧光比值比较差异无统计学意义 ($t/P = 0.581/0.592$) ,见图 6。

2.8 NFt1 对 HepG2 细胞线粒体超微结构的影响 空白对照组 HepG2 细胞线粒体形态正常。与空白对照组比较 ,NFt1 高剂量组和 Erastin 组 HepG2 细胞均表现出线粒体体积减小、双层膜密度增加、线粒体嵴减少及线粒体外膜破裂。与 NFt1 高剂量组比较 ,NFt1 + Fer-1 组 HepG2 细胞上述线粒体损伤特征得到逆转 ,见图 7。

3 讨论

作为最常见的原发性肝癌 ,HCC 以其高发病率、高病死率以及仅约 18% 的 5 年生存率 ,持续严重威胁全球健康^[1]。手术是 HCC 根治性治疗的主要手段 ,然而多数患者在确诊时已处于中晚期 ,从而失去手术机

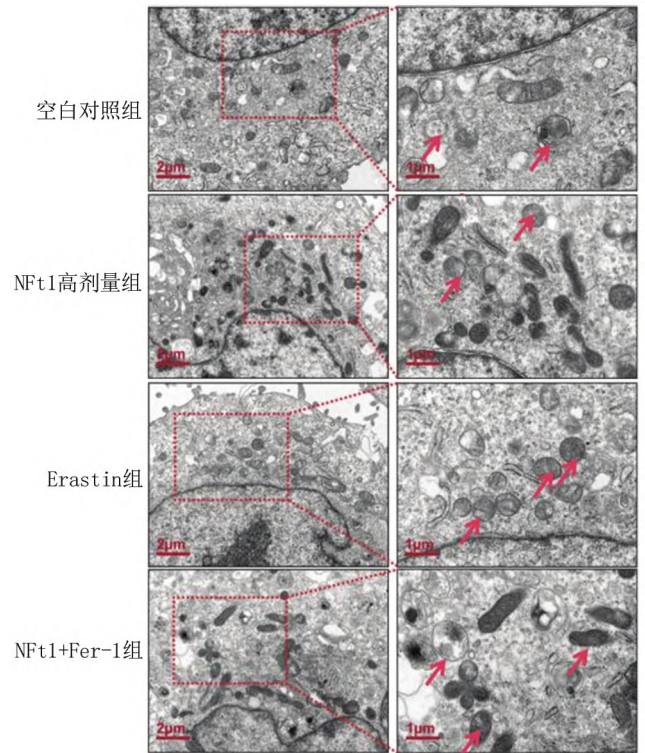


图 7 各组 HepG2 细胞线粒体超微结构 ($\times 10\ 000$)
 Fig.7 Ultrastructure of mitochondria in HepG2 cells of each group ($\times 10\ 000$)

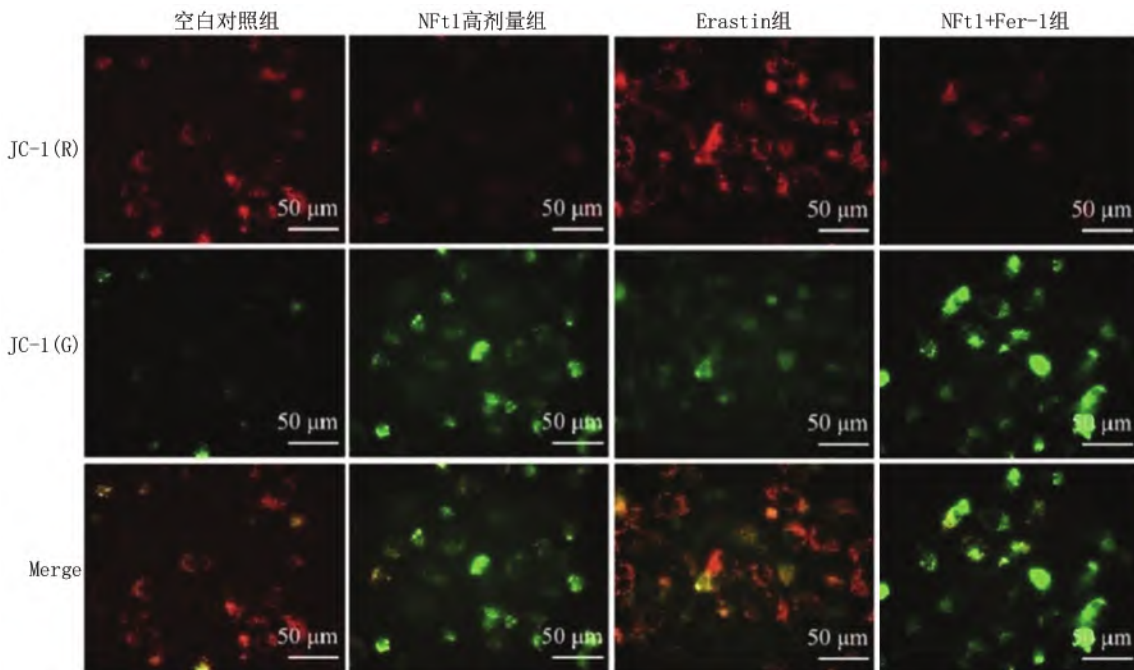


图 6 JC-1 荧光探针检测各组 HepG2 细胞线粒体膜电位 (R. 红色 ; G. 绿色 ; $\times 100$)
 Fig.6 Detection of mitochondrial membrane potential in HepG2 cells of each group by JC-1 fluorescence probe ($\times 100$)

会,且术后 2 年内复发率高达 50%;对于晚期患者,尽管可采用 FDA 批准的一线药物索拉非尼以延长生存期,但耐药性问题严重限制了其疗效^[10]。因此,寻找新的治疗药物与策略以提高 HCC 的药物敏感性,仍是当前亟待解决的关键临床问题。

传统中药凭借其低毒性和多靶点的药理特征,已成为 HCC 药物研发的重要方向^[3]。NFt1 作为中药三七的核心活性成分,逐渐受到关注,并已在多种癌症模型中展现出明确的抗肿瘤作用^[4]。陈思颖等^[5]研究发现,NFt1 可通过调控 Bax/Bcl-2/Caspase3 信号通路,抑制宫颈癌细胞迁移与侵袭并促进其凋亡。Feng 等^[6]的研究则表明,NFt1 能够通过调控 USP9X 信号通路,增加荷瘤小鼠体内 CD8⁺T 细胞比例,从而抑制结肠癌生长。然而,NFt1 在 HCC 中的作用及其机制尚未明确。本研究发现,NFt1 能够有效抑制 HepG2 细胞的增殖、侵袭和迁移,且该抑制作用呈现显著的时间-浓度依赖性。其 24 h 和 48 h 的 IC₅₀ 值分别为 6.22 μmol/L 和 2.91 μmol/L,该浓度远低于多数中药活性成分的有效作用浓度,提示 NFt1 对 HCC 细胞可能具有更强的靶向抑制潜力^[4-5]。这为应对 HCC 治疗中药物敏感性不足的挑战,提供了一个新的候选研究方向。

铁死亡是一种以脂质过氧化和铁积累为核心生物学特征的程序性细胞死亡形式,其机制不同于凋亡^[7]。近年来研究发现,HCC 的发生发展与铁死亡密切相关,该过程的关键调控节点包括系统 X^{c-} 亚基 xCT 和 GPX4,其中脂质过氧化发挥着关键作用:ROS 与铁积累相互促进,加剧氧化应激并最终破坏细胞膜结构^[11]。目前常用的铁死亡诱导剂(如厄拉司汀、索拉非尼)主要通过靶向 xCT 或 GPX4 发挥作用,而使用 DCFH-DA 荧光探针结合 MDA 检测可全面评估细胞内的脂质过氧化水平^[12-13]。以往关于 NFt1 抗肿瘤作用的研究多集中于其促进凋亡或化疗特性,但 NFt1 是否通过诱导铁死亡来抑制 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移,目前尚缺乏证据,其相关机制亦不明确^[5-6]。本研究显示,NFt1 引起的 Fe²⁺ 水平升高、GSH 耗竭及 ROS/MDA 积累,本质上是对该调控轴系的靶向破坏;xCT 作为胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白,其表达下调直接导致胱氨酸摄取减少,从而引起 GSH 合成原料不足;而 GPX4 作为清除脂质过氧化物的关键酶,其表达降低进一步阻断了脂质过氧化物的代谢通路,最终形成“铁积累-氧化应激”恶性循环,引发铁死亡。

铁死亡受多种转录因子和信号通路调控,是一个复杂的生物学过程,进一步的机制研究表明,NFt1 对

铁死亡的诱导作用依赖于对 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路的抑制^[14]。Nrf2 作为抗氧化应激的核心转录因子,其核转位能力下降直接导致下游 HO-1、GPX4 等靶基因的转录受阻:HO-1 表达下调削弱了其分解血红素、减少游离铁释放的功能,从而加剧细胞内铁超载;而 GPX4 的转录抑制则直接切断了脂质过氧化物的清除途径,二者协同作用,显著增强了氧化损伤^[15-18]。在 NCC 肿瘤组织中,Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路呈现异常激活状态,且与铁死亡水平呈负相关,抑制该通路活性可显著升高肿瘤细胞的铁死亡水平,说明 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路是促进 NSCLC 铁死亡的关键调控靶点^[19-20]。此外,线粒体作为铁死亡的关键效应器官,其膜电位下降、结构损伤(体积缩小、嵴减少、外膜破裂)并非单纯的伴随现象,而是 NFt1 抑制 Nrf2 通路后引发的下游关键事件——Nrf2 通路受损导致线粒体抗氧化能力下降,进而诱发线粒体膜脂质过氧化,最终破坏线粒体结构与功能,形成“通路抑制-线粒体损伤-铁死亡”的级联反应^[21]。铁死亡抑制剂 Fer-1 能够逆转上述过程,进一步证实线粒体损伤是 NFt1 诱导铁死亡的核心环节,而不是非特异性的细胞毒性作用。

与经典铁死亡诱导剂 Erastin 相比,NFt1 表现出以下显著特征:(1)作用多效性:Erastin 主要通过抑制 xCT 功能诱发铁死亡,而 NFt1 可同时靶向 xCT 表达与 Nrf2 通路,形成“直接抑制转运蛋白功能+间接阻断转录调控”的双重作用模式,其调控更为全面^[11];(2)机制特异性:NFt1 所诱导的铁死亡可被 Fer-1 完全逆转,提示铁死亡是其抗 HCC 作用的核心机制,而非次要或伴随途径;(3)潜在安全性优势:NFt1 作为中药活性成分,其有效浓度范围(2~6 μmol/L)远低于已知毒性阈值,且三七提取物在临床应用中已表现出良好的低毒特性,这为后续体内试验及临床转化提供了重要基础^[4,6,16]。

本研究的局限性在于仅基于 HepG2 细胞系验证了 NFt1 的作用,尚未在其他 HCC 细胞系及体内动物模型中进行验证,后续需补充相关实验以进一步明确 NFt1 作用的普遍性;此外,本研究未考察 NFt1 与索拉非尼等临床常用药物的协同效应,未来可进一步探索 NFt1 在逆转 HCC 耐药方面的潜在价值。

4 结 论

本研究证实,NFt1 对人肝癌 HepG2 细胞的增殖、迁移及侵袭具有显著抑制作用,且该效应呈现明确的时间-浓度依赖性。其核心作用机制为 NFt1 通过靶向抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 通路激活,下调 xCT、GPX4 等关键蛋白表达,破坏 xCT/GSH/GPX4 轴的稳态平

衡,进而引发细胞内 Fe²⁺ 超载、ROS 与 MDA 积累及 GSH 耗竭,最终诱导 HepG2 细胞发生铁死亡。同时, Nrf1 可导致线粒体膜电位下降、结构损伤(体积缩小、嵴减少、外膜破裂),而铁死亡抑制剂 Fer-1 能逆转上述线粒体损伤及铁死亡过程,证实线粒体功能障碍是其关键介导环节。与经典铁死亡诱导剂 Erastin 相比, Nrf1 作用更全面且具有潜在低毒优势。本研究为 HCC 治疗提供了新的候选药物与特异性作用靶点,丰富了中药活性成分抗 HCC 的分子机制研究,为后续体内试验及临床转化奠定了重要基础。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

孙娴:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;李芳兰:实施研究过程,分析实验数据;商洋洋:实施研究过程,资料搜集整理;郑百战:论文修改;孙英:文献调研与整理,论文审核;王轲:实施研究过程,资料搜集整理,分析实验数据

参考文献

[1] Ganesan P, Kulik LM. Hepatocellular carcinoma: New developments [J]. Clin Liver Dis, 2023, 27(1): 85-102. DOI: 10.1016/j.cld.2022.08.005.

[2] 岳新雨,程思谟,史园荣,等. 三氧化二砷经纳米载药应用于肝癌研究进展[J]. 疑难病杂志, 2025, 24(8): 1016-1020. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2025.08.024.

[3] Naeem A, Hu P, Yang M, et al. Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives [J]. Molecules, 2022, 27(23): 629-652. DOI: 10.3390/molecules27238961.

[4] 晏丽缘,曹昱,彭莉芳,等. 三七皂苷的主要药理活性及其作用机制研究进展[J]. 人参研究, 2025, 37(2): 81-88. DOI: 10.3969/j.issn.1671-1521.2025.02.015.

[5] 陈思颖,李瑜,唐小雨,等. 三七皂苷 F1 对宫颈癌 Siha 细胞迁移、侵袭及凋亡的影响及其机制研究[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(12): 2154-2160. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2024.12.002.

[6] Feng Y, Li Y, Ma F, et al. Notoginsenoside Ft1 inhibits colorectal cancer growth by increasing CD8(+) T cell proportion in tumor-bearing mice through the USP9X signaling pathway [J]. Chin J Nat Med, 2024, 22(4): 329-340. DOI: 10.1016/S1001-604X(24)60045-8.

[7] Zhao L, Zhou X, Xie F, et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42(2): 88-116. DOI: 10.1002/cac2.12184.

[8] 赵印生,鲍龙,孙铁霖,等. 银杏素通过抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路诱导神经胶质瘤细胞铁死亡[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(18): 3366-3370. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2023.18.008.

[9] Wang LL, Kang ML, Liu CW, et al. Panax notoginseng saponins activate nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to inhibit ferroptosis and attenuate inflammatory injury in cerebral ischemia-reperfusion

[J]. Am J Chin Med, 2024, 52(3): 821-839. DOI: 10.1142/S0192415X24500455.

[10] Tang W, Chen Z, Zhang W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Theoretical basis and therapeutic aspects [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 87. DOI: 10.1038/s41392-020-00276-0.

[11] Ajoolabady A, Tang D, Kroemer G, et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: Mechanisms and targeted therapy [J]. Br J Cancer, 2023, 128(2): 190-205. DOI: 10.1038/s41416-022-01871-8.

[12] Zhang X, Sui S, Wang L, et al. Inhibition of tumor propellant glutathione peroxidase 4 induces ferroptosis in cancer cells and enhances anticancer effect of cisplatin [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3425-3437. DOI: 10.1002/jcp.29491.

[13] Xie Q, Sun Y, Xu H, et al. Ferrostatin-1 improves BMSC survival by inhibiting ferroptosis [J]. Arch Biochem Biophys, 2023, 736(1): 109535. DOI: 10.1016/j.abb.2023.109535.

[14] Shan Y, Yang G, Huang H, et al. Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1 as a novel diagnostic and prognostic indicator that correlates with ferroptosis and the malignant phenotypes of liver cancer cells [J]. Front Oncol, 2020, 10(3): 592413. DOI: 10.3389/fonc.2020.592413.

[15] Yang W, Wang Y, Zhang C, et al. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation [J]. Front Pharmacol, 2022, 13(4): 865689. DOI: 10.3389/fphar.2022.865689.

[16] Yang R, Gao W, Wang Z, 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(6): 155135. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155135.

[17] 唐佳欣,方成志,张丙宏.核因子 E2 相关因子 2 介导铁死亡在新生儿缺氧缺血性脑病中的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2025, 24(1): 112-116. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2025.01.022.

[18] 周凡,高扬,胡艳平,等. 吴茱萸碱通过调节核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1/核因子-κB 信号通路对白细胞介素 1β 诱导的软骨细胞炎性损伤的影响[J]. 河北中医, 2024, 46(12): 2029-2034. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2619.2024.12.019.

[19] 周坛雷,张淑平,赵振翔,等. 非小细胞肺癌脑转移患者肺癌组织 Nrf2 基因和蛋白表达及对脑转移预测价值[J]. 临床误诊误治, 2022, 35(8): 52-56. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3429.2022.08.013.

[20] Shi B, Li YP, Gan Z, et al. Monotropin induced ferroptosis to alleviate the progression of hepatocellular carcinoma via regulating Nrf2/HO-1/GPX4 axis [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2025, 41(8): e70034. DOI: 10.1002/kjm2.12897.

[21] Li J, Jia YC, Ding YX, et al. The crosstalk between ferroptosis and mitochondrial dynamic regulatory networks [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(9): 2756-2771. DOI: 10.7150/ijbs.85642.

(收稿日期: 2025-10-02)