

# 雄黄抑制食管癌细胞增殖、侵袭并诱导细胞铁死亡

陈发章<sup>1</sup>,王君<sup>2</sup>,徐海珍<sup>2</sup>,郭占芳<sup>2</sup>,杨如意<sup>2</sup>

(青海大学1.医学院、2.附属医院中西医结合科,青海 西宁 810001)

doi:10.12360/CPB202111117

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2023)01-0108-08

中国图书分类号:R282.76;R329.28;R591.1;R735.102.2

**摘要:**目的 探讨雄黄对食管癌细胞增殖、侵袭及铁死亡的影响。方法 不同浓度雄黄(0、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )或雄黄 1/2IC<sub>50</sub>、IC<sub>50</sub>、2IC<sub>50</sub> 作用于食管癌细胞 Eca109、KYSE150,采用 CCK-8 法检测其抑制率;克隆形成实验检测克隆形成;划痕实验检测细胞迁移;Transwell 小室实验检测细胞侵袭;免疫荧光染色检测细胞谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、上皮性钙黏附素(E-cadherin)、锌指转录因子(Slug)、神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)表达;Western blot 检测细胞 E-cadherin、Slug、N-cadherin 蛋白表达;ELISA 检测细胞丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPXS)活性;透射电镜观察细胞超微结构;普鲁士蓝染色观察细胞内铁颗粒分布。结果

雄黄呈浓度和时间依赖性抑制 Eca109、KYSE150 细胞增殖,其 IC<sub>50</sub> 分别为 63.683  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50.344  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;与空白组相比,雄黄 2IC<sub>50</sub> 组 Eca109、KYSE150 细胞迁移数、细胞侵袭数、N-cadherin、Slug、GPX4 表达及 MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ ),E-cadherin 表达和 SOD、GSH、GPXS 活性明显升高( $P < 0.05$ );且雄黄 2IC<sub>50</sub> 组 Eca109、KYSE150 细胞内线粒体嵴变短变少甚至消失,发现大小各异的蓝染颗粒。结论

雄黄可抑制 Eca109、KYSE150 细胞增殖、迁移和侵袭,诱导细胞铁死亡,可能是治疗食管癌潜在药物。

**关键词:**食管癌;雄黄;铁死亡;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



食管癌(esophageal cancer, EC)是消化系统恶性肿瘤之一,全世界每年约有 57 万新发病例及 50

收稿日期:2022-08-01,修回日期:2022-10-10

基金项目:青海省科学技术厅课题(No 2021-ZJ-730)

作者简介:陈发章(1996-),男,硕士生,研究方向:中医药防治消化道肿瘤,E-mail:dr\_chen2022@163.com;

杨如意(1971-),女,硕士,教授,主任医师,研究方向:中西医结合防治肿瘤,通信作者,E-mail:yangruiyi202110@163.com

万死亡病例<sup>[1]</sup>。EC 的发病具有明显的地域性,统计显示,欧洲、美洲和大洋洲的 EC 发病率相对较低,而非洲和亚洲的 EC 发病率较高,中国 EC 发病率是全球最高的国家之一,也存在明显的地域差异,多发于农村、山区等贫困地区<sup>[2]</sup>。尽管食道切除、放射治疗、化疗和分子靶向药物等治疗方法取得了巨大进展,但其 5 年生存率仍不到 20%<sup>[3]</sup>。因此,寻找新的治疗药物势在必行。

雄黄(realgar, REA)分子式为 As<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 或 As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>,是一种含有砷化合物的中药,其在中医中被广泛应用已有多年的历史<sup>[4]</sup>。研究表明,REA 具有镇痛、消炎、提高免疫力等作用,且对多种血液系统肿瘤、胃癌、宫颈癌、乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌等具有抑制肿瘤生长,促进凋亡的作用<sup>[5]</sup>。最新研究证实,雄黄纳米颗粒通过抑制基质金属蛋白酶 MMP-2、9 表达和血管生成,在小鼠乳腺癌移植瘤中抑制肿瘤细胞的迁移、侵袭<sup>[6]</sup>。这些研究证明,REA 是一种潜在的抗肿瘤药物,对肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭具有抑制效果。然而,REA 对 EC 的干预效果尚未完全清晰。

研究表明,在一些癌细胞中存在一种铁依赖的细胞死亡形式,称为铁死亡,与细胞坏死和凋亡不同,铁死亡是亚铁与脂质过氧化反应引起的,抑制谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的防御蛋白可能选择性地激活铁死亡<sup>[7]</sup>。GPX4 通过减少磷脂过氧化氢抑制脂质过氧化,在抑制铁死亡方面发挥重要作用,此外,GPX4 对于肿瘤复发也是必需的<sup>[8]</sup>。当发生铁死亡时,线粒体减少,伴随着双层膜密度的增加和结构完整性的丧失,线粒体跨膜电位降低,氧化磷酸化降低<sup>[9]</sup>。为临床利用铁死亡方式治疗肿瘤提供了理论依据。然而,铁死亡在恶性肿瘤治疗中的有效程度还远未可知。因此,本研究拟通过体外实验研究雄黄对 EC 铁死亡的影响,为其应用于临床治疗 EC 提供理论依据和研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人食管癌细胞系 Eca109、KYSE150 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

**1.2 主要试剂及仪器** 雄黄干粉(编号 SA4101)购自湖北诺纳科技有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 BS350A)购自上海 Biosharp 公司; 结晶紫(批号 C8470)购自北京索莱宝科技有限公司; 基底胶(Matrigel, 批号 356234)购自美国 Corning; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为 ZC-32524、ZC-32619、ZC-33229、ZC-33141)购自上海茁彩生物科技有限公司; GPX4 兔克隆抗体、E-cadherin 兔克隆抗体、Slug 兔克隆抗体、N-cadherin 兔克隆抗体、 $\beta$ -actin 兔克隆抗体(批号分别为 A13309、A3044、A1057、A19083、AC026)购自武汉 abclonal; 生物素化山羊抗兔 IgG(批号 ab6721)购自英国 abcam; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0009)购自上海碧云天生物技术有限公司; ECL 发光试剂盒(批号 KF001)购自美国 Affinity; 醋酸双氧铀、枸橼酸铅(批号分别为 GS02624、GZ02616)购自北京中镜科技技术有限公司; 普鲁士蓝染色试剂盒(批号 M021)购自上海歌凡生物科技有限公司; DMI1 型倒置生物显微镜(德国 LEICA 公司); spectra max PLUS 384 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); JY200C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司); TE22 型蛋白质转膜仪(美国 Hoefer 公司); Panthera 型数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); JEM-1400FLASH 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

**1.3 药品制备** 磷酸盐缓冲生理盐水溶解雄黄干粉, 磁力搅拌器搅拌使其充分溶解 12 h, 后经 0.2  $\mu\text{m}$  过滤器过滤混悬液, 4  $^{\circ}\text{C}$  储存备用, 部分样本送往兰州大学化学实验室测定溶液中砷的浓度, 经 ICP 发射光谱法测定得知溶液中砷的浓度为 5.498  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**1.4 细胞培养** 将细胞株 Eca109、KYSE150 在 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)中培养, 细胞培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ , 以 1:5-1:20 的比例传代, 每隔 3~5 d 传代 1 次。

**1.5 CCK-8 法检测细胞增殖** 按 100  $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$  将 Eca109、KYSE150 细胞接种于 96 孔板中, 并于每孔中加入不同浓度的雄黄(0、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )培养 24、48、72 h, 加入 CCK8 试剂(10  $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ )37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 用酶标仪在 450 nm 下测量各孔的吸光度(A)。细胞抑制率/% =  $[1 - \text{实验组 A} / \text{对照组 A}] \times 100\%$ 。

**1.6 克隆形成实验检测克隆形成能力** 按 150 个  $\cdot \text{孔}^{-1}$  将对数生长期 Eca109、KYSE150 细胞接种于

6 孔板中, 每 3 d 更换 1 次培养液。置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中培养 24 h, 加入不同浓度的雄黄(0、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )培养, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 结果按平板平均菌落数计算, 设置 3 个重复。

**1.7 划痕实验检测细胞迁移能力** 按  $4 \times 10^3$  个/孔将 ECA109 或 KYSE150 细胞接种于 96 孔培养板中, 分别设置空白组、1/2 $\text{IC}_{50}$  组、 $\text{IC}_{50}$  组、2 $\text{IC}_{50}$  组, 放置在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜, 无菌枪头进行划痕, 在 0 和 24 h 拍摄划痕区域的图像, 每组设置 3 个重复。

**1.8 Transwell 小室实验检测细胞侵袭** ECA109 或 KYSE150 细胞分别设置空白组、1/2 $\text{IC}_{50}$  组、 $\text{IC}_{50}$  组、2 $\text{IC}_{50}$  组。将稀释(1:5)的基质胶加入 Transwell 上室中, 200  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液添加到上室, 500  $\mu\text{L}$  含有 20% FBS 的培养基添加到下室。药物作用后, 将小室置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培养 24 h, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 每孔选取 5 个视野在光学显微镜下拍照, 统计各组迁移细胞数目。

**1.9 免疫荧光染色检测细胞 GPX4、E-cadherin、Slug、N-cadherin 表达** 对数生长期 Eca109、KYSE150 细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板, 分别设置空白组、1/2 $\text{IC}_{50}$  组、 $\text{IC}_{50}$  组、2 $\text{IC}_{50}$  组, 处理 24 h, 用 4% 多聚甲醛固定, 然后用 0.3% 的 Triton  $\times 100$  对细胞膜进行渗透。用 10% 牛血清液封闭细胞后, 用以下一抗在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜: 抗 GPX4、抗 E-cadherin、抗 Slug、抗 N-cadherin。然后将细胞与合适的 FITC 或 TRITC 偶联的二抗(KLP)在室温下孵育 1 h, 未结合的抗体被洗掉, 细胞用含有 DAPI 的固定介质固定于玻片上, 倒置荧光显微镜拍照, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定 GPX4、E-cadherin、Slug、N-cadherin 表达水平。

**1.10 Western blot 检测细胞 E-cadherin、Slug、N-cadherin 蛋白表达** 对数生长期 Eca109、KYSE150 细胞接种于细胞培养瓶中, 分别设置空白组、1/2 $\text{IC}_{50}$  组、 $\text{IC}_{50}$  组、2 $\text{IC}_{50}$  组, 处理 24 h。细胞用预冷的 PBS 洗涤两次, 后在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 用全细胞裂解缓冲液在冰上裂解半小时, 然后将裂解液在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 3 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 收集上清液, BCA 法检测蛋白浓度, 用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质样品, 并将其电泳转移到聚偏氟乙烯膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。然后将膜与下列一级抗体在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜: 抗 E-cadherin(1:1 000)、抗 Slug(1:2 000)、抗 N-cadherin(1:2 000)、抗  $\beta$ -actin(1:10 000)。然后加入生

物素化山羊抗兔 IgG, 室温下孵育 1.5 h, 洗涤, ECL 显影。采用 Image Pro Plus 软件分析各蛋白条带的灰度值, 计算蛋白相对表达量。

**1.11 ELISA 检测细胞内 MDA、SOD、GSH、GPXS 活性** 取对数生长期 Eca109、KYSE150 细胞, 设置分组为空白组、1/2IC<sub>50</sub> 组、IC<sub>50</sub> 组、2IC<sub>50</sub> 组, 培养 24 h 后收集细胞, 采用 ELISA 试剂盒按说明书测定细胞 MDA、SOD、GSH、GPXS 活性。

**1.12 透射电镜检测线粒体超微结构** ECA109 或 KYSE150 细胞分别设置空白组、1/2IC<sub>50</sub> 组、IC<sub>50</sub> 组、2IC<sub>50</sub> 组, 培养 24 h, 细胞经固定、包埋、染色后, 用透射电镜拍摄线粒体形态。

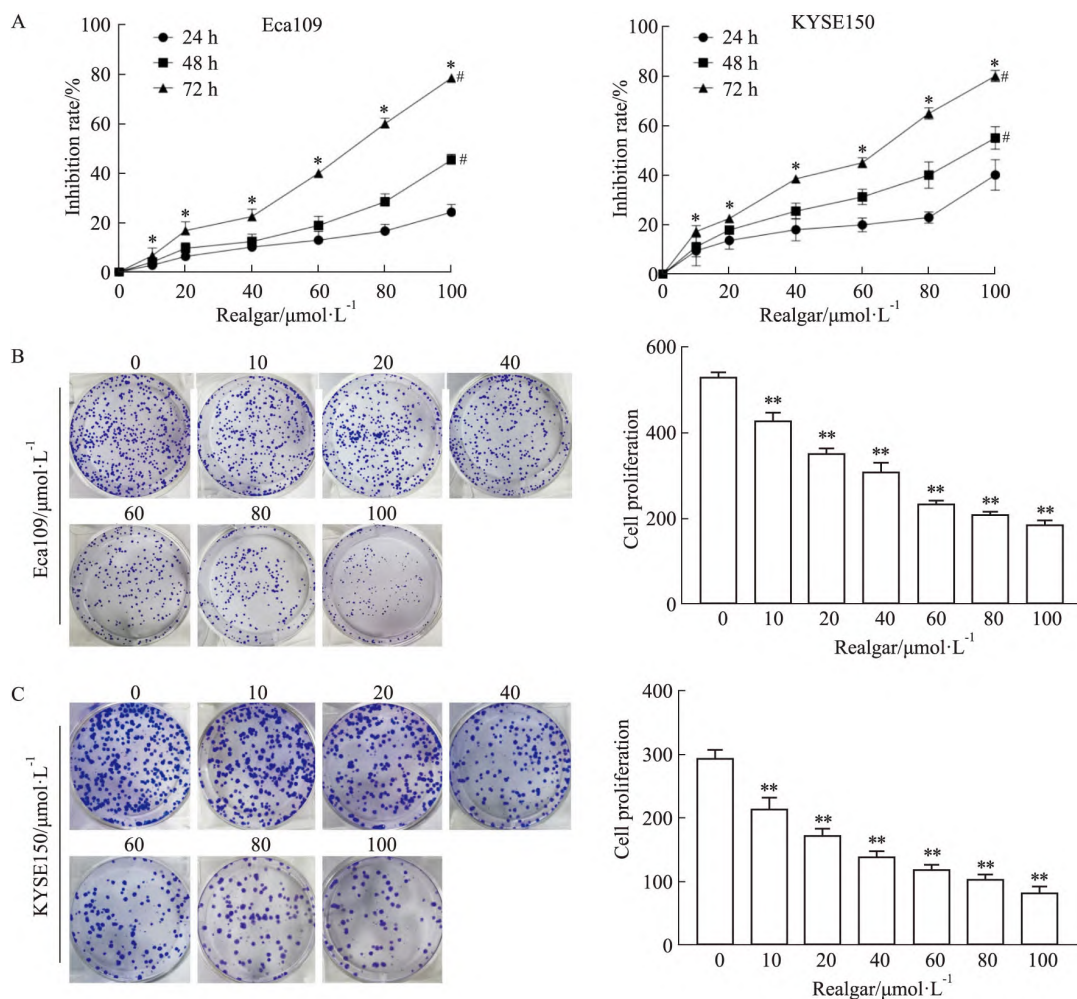
**1.13 普鲁士蓝染色观察细胞内铁颗粒分布** 取对数生长期 Eca109、KYSE150 细胞, 设置分组为空白组、1/2IC<sub>50</sub> 组、IC<sub>50</sub> 组、2IC<sub>50</sub> 组, 培养 24 h 后收集细胞, 4% 多聚甲醛固定, Perl 试剂孵育, 1% 核坚固红

复染 3 min, PBS 洗去多余核坚固红后, 应用数码三目摄影显微镜采集图像, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集图像的光密度 (IOD) 和面积 (Area), 计算阳性表达面积百分率。

**1.14 统计分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA)。

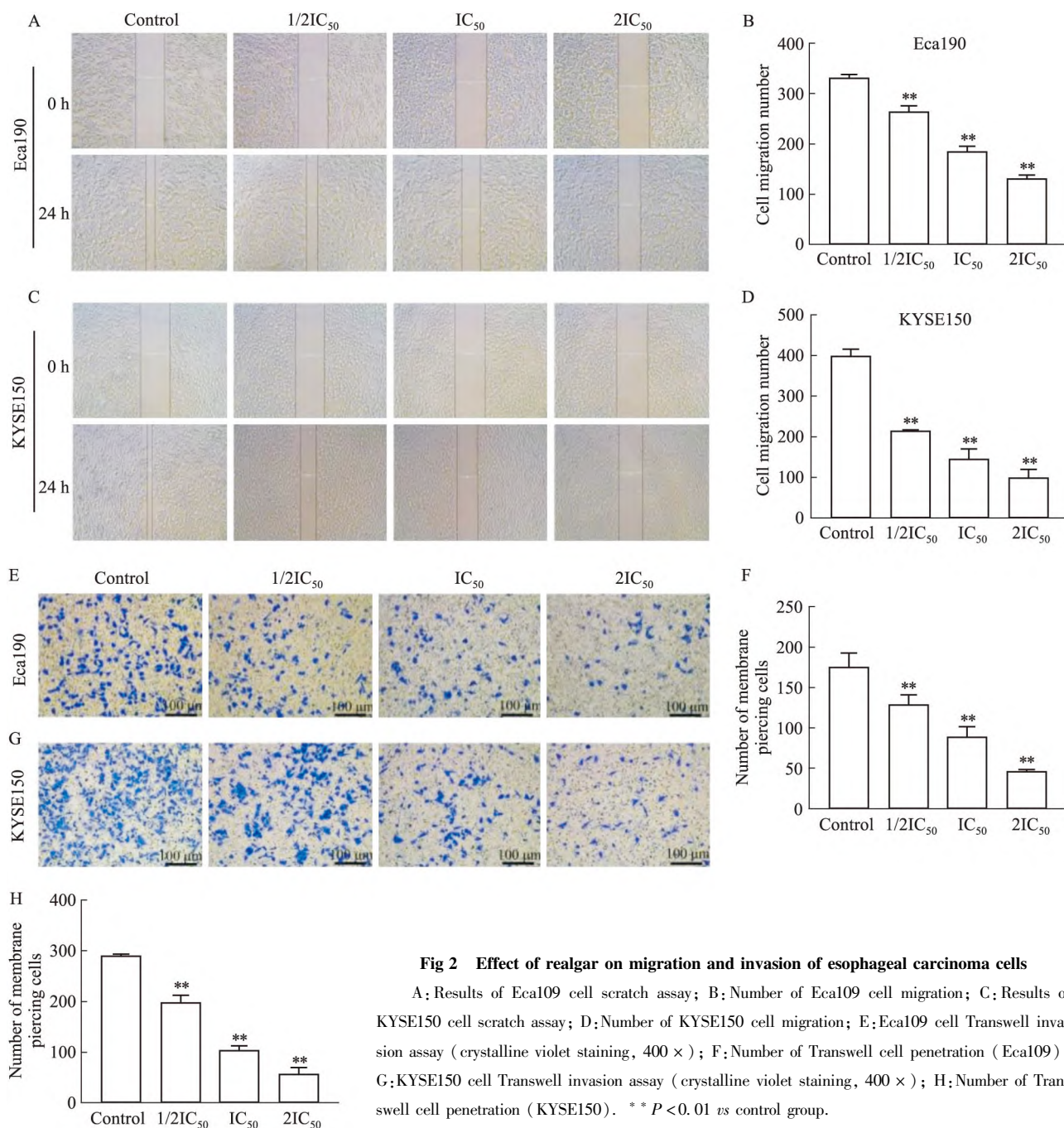
**2 结果**

**2.1 雄黄对食管癌细胞增殖的影响** CCK-8 检测结果显示, 随着雄黄浓度的增加, Eca109、KYSE150 细胞增殖减慢, 在雄黄浓度相同条件下, 随着时间延长, Eca109、KYSE150 细胞抑制率越高 ( $P < 0.05$ ), 雄黄作用 Eca109、KYSE150 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 63.683  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50.344  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。克隆形成实验结果显示, Eca109、KYSE150 细胞增殖依赖雄黄浓度增高而呈现降低趋势 ( $P < 0.01$ ), 见 Fig 1。



**Fig 1 Effect of realgar on proliferation of esophageal carcinoma cells**

A: Results of CCK-8 assay on the inhibitory rate of Eca109 and KYSE150 cells at different concentrations of realgar (24, 48, 72 h); B: Results of clone formation assay on the proliferation of Eca109 and KYSE150 cells at different concentrations of realgar; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  group, #  $P < 0.05$  vs 24 h of realgar effect.

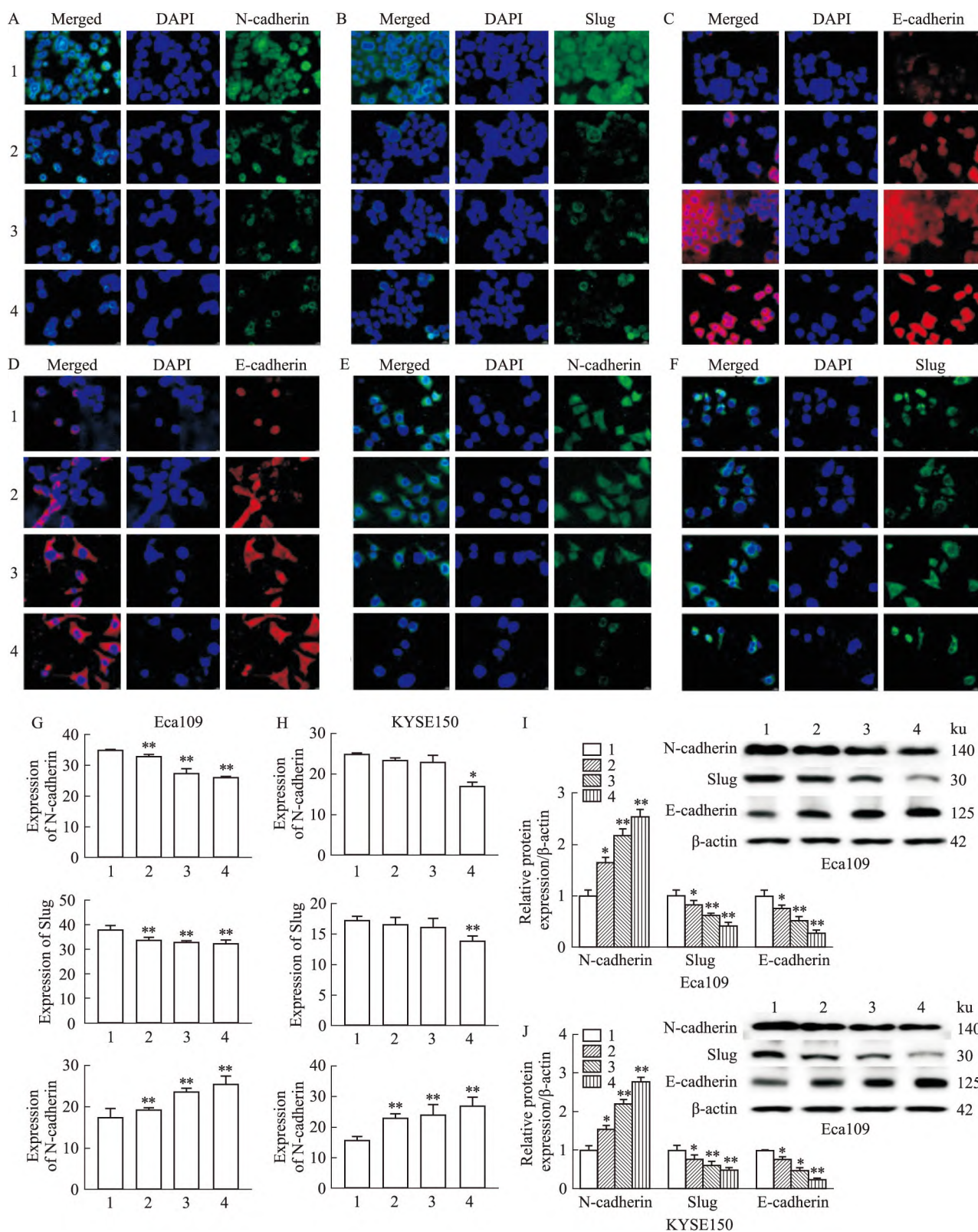


**2.2 雄黄对食管癌细胞迁移、侵袭的影响** 划痕实验结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2  $IC_{50}$  组、 $IC_{50}$  组、2  $IC_{50}$  组明显减慢了 Eca190、KYSE150 细胞平面迁移的能力,24 h 时空白组 Eca190、KYSE150 细胞几乎完全融合,而 1/2  $IC_{50}$  组、 $IC_{50}$  组、2  $IC_{50}$  组 Eca190、KYSE150 细胞迁移数明显减少 ( $P < 0.01$ )。Transwell 小室实验结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2  $IC_{50}$  组、 $IC_{50}$  组、2  $IC_{50}$  组明显降低细胞侵袭数 ( $P < 0.01$ ),见 Fig 2。

**2.3 雄黄对食管癌细胞上皮间质转化 (EMT) 的影响** 免疫荧光染色结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2  $IC_{50}$  组、 $IC_{50}$  组、2  $IC_{50}$  组 Eca190 细胞 N-cadherin、

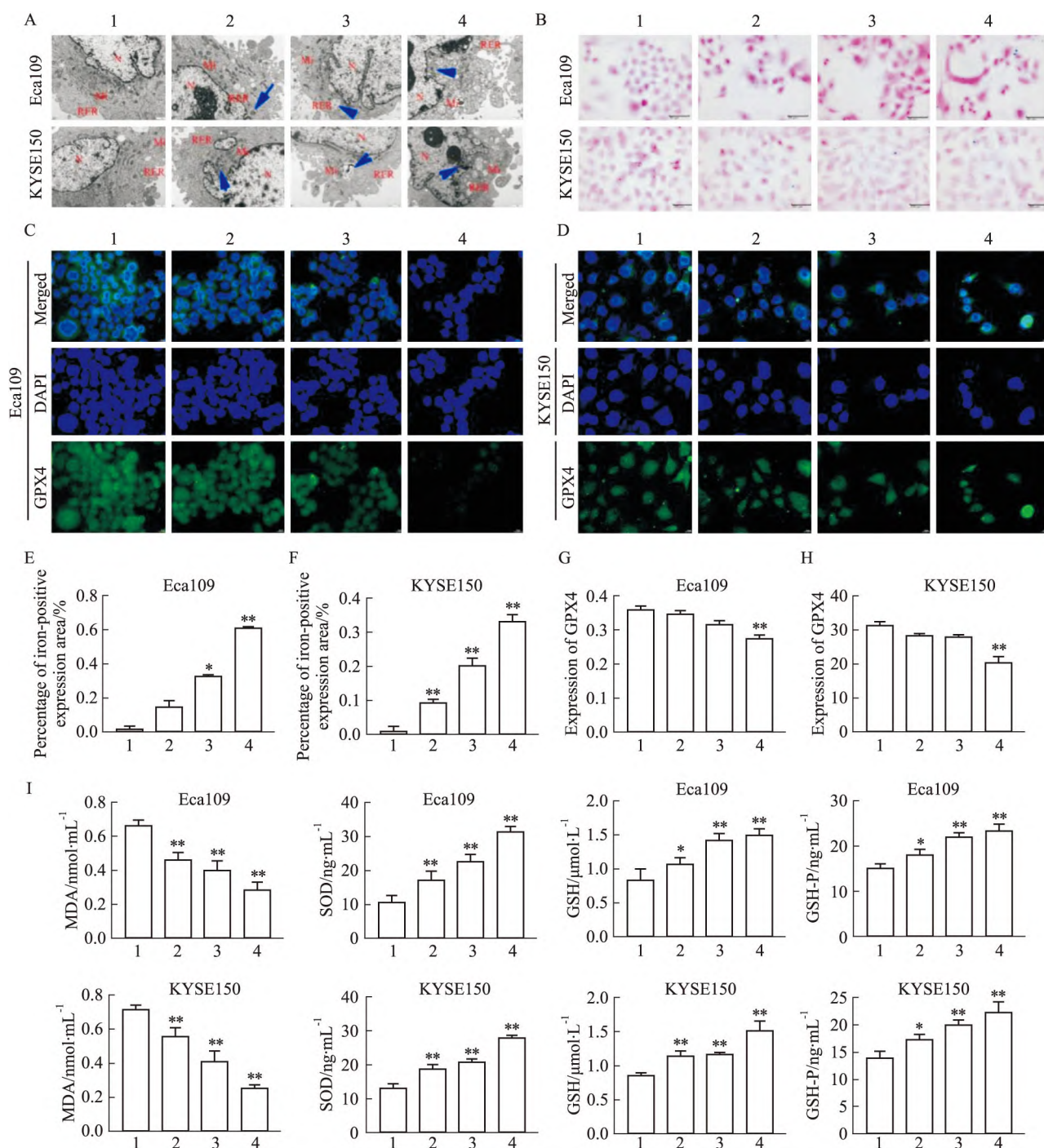
Slug 表达明显降低,E-cadherin 表达明显升高 ( $P < 0.01$ );雄黄 2  $IC_{50}$  组 KYSE150 细胞 N-cadherin、Slug 蛋白表达明显降低,E-cadherin 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ , Fig 3D、E、F、H)。Western blot 检测结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2  $IC_{50}$  组、 $IC_{50}$  组、2  $IC_{50}$  组 Eca190、KYSE150 细胞 N-cadherin、Slug 蛋白相对表达量明显降低,E-cadherin 蛋白相对表达量明显升高 ( $P < 0.05$ ),见 Fig 3。

**2.4 雄黄对食管癌细胞铁死亡的诱导作用** 透射电镜观察结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2  $IC_{50}$  组 Eca190、KYSE150 细胞质内发生自噬,雄黄  $IC_{50}$  组 Eca190、KYSE150 细胞质内少量线粒体发生肿胀、



**Fig 3 Effect of realgar on epithelial mesenchymal transformation of esophageal carcinoma cells**

1: Control; 2: 1/2IC<sub>50</sub>; 3: IC<sub>50</sub>; 4: 2IC<sub>50</sub>. A; Eca109 cell N-cadherin immunofluorescence staining (400 ×); B; Eca109 cell Slug immunofluorescence staining (400 ×); C; Eca109 cell E-cadherin immunofluorescence staining (400 ×); D; KYSE150 cell E-cadherin immunofluorescence staining (400 ×); E; KYSE150 cell N-cadherin immunofluorescence staining (400 ×); F; KYSE150 cell Slug immunofluorescence staining (400 ×); G; Quantitative analysis of N-cadherin, Slug, E-cadherin expression in Eca109 cell; H; Quantitative analysis of N-cadherin, Slug, E-cadherin expression in KYSE150 cell; I; Relative expression of N-cadherin, Slug, E-cadherin protein in Eca109 cells; J; Relative expression of N-cadherin, Slug, E-cadherin protein in KYSE150 cells; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.



**Fig 4 Induction of ferroptosis in esophageal carcinoma cells by realgar**

1:Control ;2:1/2IC<sub>50</sub>;3:IC<sub>50</sub>;4:2IC<sub>50</sub>. A:Transmission electron microscopy of Eca109 and KYSE150 cells [ nucleus (N), mitochondria (Mi), rough endoplasmic reticulum (RER), autophagy (↑), 15 000 × ]; B:Prussian blue staining of Eca109 and KYSE150 cells (400 × ); C:GPX4 immunofluorescence staining of Eca109 cells (400 × ); D:GPX4 immunofluorescence staining of KYSE150 cells (40 × ); E:Area percentage of iron positive expression in Eca109 cells; F:Area percentage of iron positive expression in KYSE150 cells; G:GPX4 protein expression in Eca109 cells; H:GPX4 protein expression in KYSE150 cells; I:the contents of MDA, SOD, GSH, GPXS in Eca109, KYSE150 cells. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs control group.

自噬,雄黄 2 IC<sub>50</sub>组 Eca109、KYSE150 细胞胞质内大量线粒体发生肿胀、自噬,粗面内质网扩张,线粒体嵴变短变少甚至消失。普鲁士蓝染色结果显示,空白组无蓝染颗粒,雄黄 1/2 IC<sub>50</sub>组、IC<sub>50</sub>组、2 IC<sub>50</sub>组 Eca109、KYSE150 细胞均能发现大小各异、多少不

等的蓝染颗粒,与空白组相比,雄黄 IC<sub>50</sub>组、2 IC<sub>50</sub>组 Eca109、KYSE150 细胞铁阳性表达面积百分率均明显升高(P < 0.05)。免疫荧光染色结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2 IC<sub>50</sub>组、IC<sub>50</sub>组、2 IC<sub>50</sub>组 GPX4 荧光强度逐渐减弱,且雄黄 2 IC<sub>50</sub>组 Eca109、KYSE150

细胞 GPX4 表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。ELISA 检测结果显示,与空白组相比,雄黄 1/2  $IC_{50}$  组、 $IC_{50}$  组、2  $IC_{50}$  组 Eca109、KYSE150 细胞 MDA 含量明显降低, SOD、GSH、GPXS 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见 Fig 4。

### 3 讨论

目前,EC 在治疗上仍是一个难题。中医认为“邪气进入”是 EC 发展和进展的主要原因,建议采用“毒邪”的治疗方法<sup>[10]</sup>。《神农本草经》记载雄黄味苦,平,寒,主寒热,鼠瘻,恶疮,疽痔,死肌,恶鬼,邪气,百虫,肿毒<sup>[5]</sup>。研究表明纳米雄黄能显著抑制乳腺癌细胞体外迁移、侵袭及体内肺、肝转移<sup>[6]</sup>。此外,雄黄通过阻断肿瘤细胞黏附,降低肿瘤细胞破坏基底膜的能力,从而抑制胃癌细胞的迁移和侵袭<sup>[11]</sup>。在本研究中,我们发现 Eca109、KYSE150 细胞增殖依赖雄黄浓度增高而呈现降低趋势,其作用 Eca109、KYSE150 细胞的  $IC_{50}$  分别为 63.683、50.344  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 因此,本研究中使用 1/2  $IC_{50}$ 、 $IC_{50}$ 、2  $IC_{50}$  作为雄黄处理浓度。研究已表明细胞上皮间质转化 (EMT) 是肿瘤转移的关键过程, E-cadherin 抑制 EMT, Slug 促进 EMT 诱导的细胞迁移, N-cadherin 在食管鳞癌组织中高表达,也与肿瘤转移有关<sup>[12]</sup>。在本研究中,雄黄 2  $IC_{50}$  作用增强了食管癌细胞 E-cadherin 的表达,降低了细胞 N-cadherin、Slug 表达,且划痕实验和 Transwell 小室实验也表明雄黄作用明显降低了细胞迁移数和细胞侵袭数。表明雄黄具有抑制 EC 细胞增殖、迁移和侵袭的作用。

细胞死亡是细胞生命过程的终结,该过程对机体的生存和发展意义重大,诱导肿瘤细胞死亡是癌症治疗的主要策略,铁死亡是一种铁依赖性脂质氧化应激引起的非凋亡细胞死亡<sup>[13]</sup>。铁死亡的激活可以抑制肿瘤细胞增殖,细胞内铁水平和脂质过氧化是铁死亡的基本特征<sup>[14]</sup>。GPX4 作为一种磷脂-过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶,可以抑制肿瘤细胞的铁死亡,GPX4 在肝细胞癌和结肠癌中高表达,且 GPX4 高表达是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和肺腺癌的不良预后因素<sup>[8,15]</sup>。此外,Zhang 等<sup>[16]</sup>研究表明,冬凌草甲素给药后食管癌 TE1 细胞中 GPX4 活性降低,且与冬凌草甲素作用后细胞内  $\text{Fe}^{2+}$ 、脂质过氧化产物、丙二醛 (MDA)、细胞内活性氧 (ROS) 积聚相一致。Shishido 等<sup>[17]</sup>也报道了类似的机制,他们证明 GPX4 上调是食管鳞状细胞癌的不良预后因素,5-氨基乙酰丙酸抑制 GPX4 在肿瘤组织中的过度表达可导致肿瘤体积缩小。本研究结果显示,雄

黄 2 $IC_{50}$  可导致食管癌细胞 GPX4 明显下调,并降低细胞 MDA 含量,升高 SOD、GSH、GPXS 含量,雄黄作用后, Eca109、KYSE150 细胞胞质内少量线粒体发生肿胀、自噬及发现大小各异、多少不等的蓝染颗粒。表明雄黄作用后 Eca109、KYSE150 细胞发生铁死亡,可能是一种有前途的治疗药物。此外,有报道<sup>[18]</sup>称通过激活血红素加氧酶 1 (HMOX1) 和抑制 GPX4 双重机制可诱导高危神经母细胞瘤中的铁死亡。因此,雄黄作用 EC 细胞铁死亡的具体机制还有待进一步研究。

综上所述,雄黄可呈现剂量及时间依赖性地抑制 Eca109、KYSE150 细胞增殖,并抑制细胞迁移和侵袭,诱导细胞铁死亡,可能是治疗食管癌潜在药物。此外,从铁死亡方面入手深入抗癌药物的研发可能是未来进一步的研究方向。

### 参考文献:

- [1] 向辉,唐明,李阳,等. miR-664b-5p 对食管癌细胞 EC9706 和 TE-1 生物学行为的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(11):1746-53.
- [1] Xiang H, Tang M, Li Y, et al. Effect of miR-664b-5p on the biological behavior of esophageal cancer cell lines EC9706 and TE-1 [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(11):1746-53.
- [2] Short M W, Burgers K G, Fry V T. Esophageal cancer [J]. *Am Fam Physician*, 2017, 95(1):22-8.
- [3] Watanabe M, Otake R, Kozuki R, et al. Recent progress in multidisciplinary treatment for patients with esophageal cancer [J]. *Surg Today*, 2020, 50(1):12-20.
- [4] 康琪,黄倩倩,曾洁,等. 雄黄类抗癌制剂的专利研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23):226-34.
- [4] Kang Q, Huang Q Q, Zeng J, et al. Research of anticancer realgar preparations from perspective of patent [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(23):226-34.
- [5] Wang S, Luo G, Liu J, et al. Involvement of autophagy in realgar quantum dots (RQDs) inhibition of human endometrial cancer JEC cells [J]. *PeerJ*, 2020, 8:e9754.
- [6] Xi X X, Sun J, Xi D B, et al. Realgar nanoparticles inhibit migration, invasion and metastasis in a mouse model of breast cancer by suppressing matrix metalloproteinases and angiogenesis [J]. *Curr Drug Deliv*, 2020, 17(2):148-58.
- [7] Tarangelo A, Magtanong L, Biegging-Rolett K T, et al. p53 suppresses metabolic stress-induced ferroptosis in cancer cells [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3):569-75.
- [8] Ingold I, Berndt C, Schmitt S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell*, 2018, 172(3):409-22. e21.
- [9] Kuang F, Liu J, Tang D, et al. Oxidative damage and antioxidant defense in ferroptosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:586578.
- [10] Kong L, Wu Z, Zhao Y, et al. Qigesan reduces the motility of e-

- sophageal cancer cells via inhibiting Gas6/Axl and NF- $\kappa$ B expression [J]. *Biosci Rep*, 2019, **39**(6):BSR20190850.
- [11] Zhang L, Kim S, Ding W, et al. Arsenic sulfide inhibits cell migration and invasion of gastric cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, **9**:5579–90.
- [12] Antony J, Huang R Y. AXL-driven EMT state as a targetable conduit in cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, **77**(14):3725–32.
- [13] Wang Y, Wei Z, Pan K, et al. The function and mechanism of ferroptosis in cancer [J]. *Apoptosis*, 2020, **25**(11–12):786–98.
- [14] Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, **12**(1):34.
- [15] Kinowaki Y, Kurata M, Ishibashi S, et al. Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Lab Invest*, 2018, **98**(5):609–19.
- [16] Zhang J, Wang N, Zhou Y, et al. Oridonin induces ferroptosis by inhibiting gamma-glutamyl cycle in TE1 cells [J]. *Phytother Res*, 2021, **35**(1):494–503.
- [17] Shishido Y, Amisaki M, Matsumi Y, et al. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid through ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2021, **28**(7):3996–4006.
- [18] Xu T, Ding W, Ji X, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, **23**(8):4900–12.

## Realgar inhibits proliferation, invasion and induces cellular ferroptosis in esophageal cancer cells

CHEN Fa-zhang<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, XU Hai-zhen<sup>2</sup>, GUO Zhan-fang<sup>2</sup>, YANG Ru-yi<sup>2</sup>

(1. Medical College of Qinghai University, 2. Dept of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

**Abstract: Aim** To investigate the effects of realgar on the proliferation, invasion and ferroptosis of esophageal cancer cells. **Methods** Different concentrations of realgar (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) or realgar  $1/2\text{IC}_{50}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ,  $2\text{IC}_{50}$  were applied to esophageal cancer cells Eca109 and KYSE150, and the inhibitory rate was detected by CCK-8 method; the clone formation ability was detected by clone formation assay; cell migration ability was detected by scratch assay; cell invasion was detected by Transwell assay; glutathione peroxidase 4 (GPX4), epithelial cadherin (E-cadherin), zinc finger transcription factor (Slug), and neurocadherin (N-cadherin) expression were detected by immunofluorescence staining; E-cadherin, Slug, N-cadherin protein expression were detected by Western blot; intracellular malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPXS) activity were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); cellular ultrastructure was observed by transmission electron microscopy; intracellular iron particle distribution was visualized by Prussian blue staining. **Results** Realgar

inhibited the proliferation of Eca109 and KYSE150 cells in a concentration- and time-dependent manner, and the  $\text{IC}_{50}$  of realgar effect on Eca109 and KYSE150 cells was  $63.683 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $50.344 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. Compared with control group, the migration number, cell invasion number, N-cadherin, Slug, GPX4 expression and MDA content of Eca109 and KYSE150 cells in the realgar  $2\text{IC}_{50}$  group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), while E-cadherin expression and SOD, GSH and GPXS activities were significantly raised ( $P < 0.05$ ); and the mitochondrial cristae became shorter, fewer or even disappeared, and blue-stained particles of different sizes were found in Eca109 and KYSE150 cells in the realgar  $2\text{IC}_{50}$  group. **Conclusions** Realgar can inhibit the proliferation of Eca109 and KYSE150 cells, inhibit cell migration and invasion, and induce cellular ferroptosis, which may be a potential drug for the treatment of esophageal cancer.

**Key words:** esophageal cancer; realgar; ferroptosis; cell proliferation; cell migration; cell invasion