

基于 Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴探究西黄丸诱导 线粒体相关性铁死亡增敏替莫唑胺治疗 胶质母细胞瘤的机制

祝圆圆, 赵雪玲, 耿诺金, 朱新华, 唐宁^{*}
(湖南中医药大学 第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 探讨西黄丸(Xihuang Pills, XHP)通过调控核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)信号轴,诱导线粒体相关性铁死亡,从而增敏替莫唑胺(TMZ)对胶质母细胞瘤(GBM)U251 细胞的治疗效应。实验制备 XHP 含药血清,采用 CCK-8 法评估不同浓度 TMZ(0~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 XHP(0~20%)对 U251 细胞活力的影响,通过 SynergyFinder 平台筛选最佳联合抑制剂量(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ+10% XHP),建立联合干预模型。设置对照组、XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组,采用 EdU 染色与克隆形成实验评估细胞增殖能力,Transwell 小室与划痕实验检测侵袭迁移;FerroOrange 荧光探针检测 Fe^{2+} 水平,DCFH-DA 荧光探针检测活性氧(ROS)水平,JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位, Mito-PeDPP 荧光探针检测线粒体内脂质过氧化水平, Mito-Tracker Green 和 Mito-SOXTM Red 荧光染料检测线粒体形态结构和过氧化水平,透射电镜观察线粒体超微结构,比色法测定谷胱甘肽(GSH)与丙二醛(MDA)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Nrf2、HO-1、溶质载体家族成员 SLC7A11(xCT)、GPX4 蛋白表达。结果显示,XHP+TMZ 联合处理显著抑制细胞活力、增殖及迁移侵袭能力($P<0.01$),并加重 Fe^{2+} 积累、ROS 生成、GSH 耗竭及脂质过氧化($P<0.001$);线粒体膜电位明显丧失,结构严重破坏;Nrf2、HO-1、GPX4、xCT 蛋白表达明显下调,提示抗氧化铁死亡通路被协同抑制。结果表明,XHP 通过抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴,诱导线粒体相关性铁死亡,从而显著增强 TMZ 对 GBM 细胞的治疗效果,揭示中医药协同抗脑胶质瘤的新机制,为难治性脑瘤的联合治疗提供了实验依据与理论支撑。

[关键词] 西黄丸;胶质母细胞瘤;替莫唑胺;铁死亡;线粒体损伤

Xihuang Pills induce mitochondria-associated ferroptosis to enhance therapeutic efficacy of temozolomide against glioblastoma via Nrf2/HO-1/GPX4 signaling axis

ZHU Yuan-yuan, ZHAO Xue-ling, GENG Nuo-jin, ZHU Xin-hua, TANG Ning^{*}
(the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] This study aimed to investigate whether Xihuang Pills (XHP) enhance the therapeutic efficacy of temozolomide (TMZ) against glioblastoma (GBM) U251 cells by inducing mitochondria-associated ferroptosis via regulation of Nrf2/HO-1/GPX4 signaling axis. The XHP-containing serum was prepared, and the effects of various concentrations of TMZ (0-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and XHP (0-20%) on U251 cell viability were assessed by CCK-8 assay. The optimal synergistic dose (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ + 10% XHP) was identified via the SynergyFinder platform for establishing a combined intervention model. Control, XHP, TMZ, and XHP + TMZ groups were designed. Cell proliferation was evaluated by EdU staining and colony formation assay, and cell migration and invasion were

[收稿日期] 2025-06-05

[基金项目] 湖南省卫健委科研计划项目(D202304089721, W20243137);湖南中医药大学校院联合基金重点项目(2024XYLH005)

[通信作者] ^{*} 唐宁,主治医师,主要从事中西医结合防治脑胶质瘤研究, E-mail: tina8313@163.com

[作者简介] 祝圆圆,住院医师,主要从事中西医结合防治脑胶质瘤研究, E-mail: 15074991511@163.com

assessed by Transwell and wound healing assays. FerroOrange and DCFH-DA fluorescent probes were used to measure the intracellular levels of Fe^{2+} and ROS, respectively. The JC-1 fluorescent probe was used to assess mitochondrial membrane potential, while Mito-PeDPP fluorescent probe to examine mitochondrial lipid peroxidation. Mito-Tracker Green and MitoSOXTM Red were used to examine mitochondrial morphology and oxidative stress. Transmission electron microscopy was adopted to observe the mitochondrial ultrastructure. GSH and MDA levels were measured by colorimetric assays. Western blot was employed to assess the protein levels of Nrf2, HO-1, xCT, and GPX4. The results showed that, XHP + TMZ suppressed cell viability, proliferation, migration, and invasion ($P < 0.01$), increased Fe^{2+} accumulation, ROS generation, GSH depletion, and lipid peroxidation ($P < 0.001$), reduced mitochondrial membrane potential, caused severe structural damage, and down-regulated the protein levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and xCT, which indicated that the antioxidant ferroptosis-protective pathway was co-inhibited. In conclusion, XHP enhances TMZ-induced ferroptosis in GBM cells by suppressing the Nrf2/HO-1/GPX4 signaling axis. The findings provide new mechanism insights into the synergistic antitumor effect of traditional Chinese medicine in glioblastoma therapy and offer experimental evidence for the treatment of refractory brain tumors with combined strategies.

[Key words] Xihuang Pills; glioblastoma; temozolomide; ferroptosis; mitochondrial damage

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250825.501

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是中枢神经系统最具侵袭性和致死性的恶性肿瘤,具有生长速度快、异质性强、术后复发率高及对现有治疗手段耐药性显著等临床特点^[1]。目前,一线化疗药物替莫唑胺(TMZ)虽可在一定程度上延缓疾病进展,但由于肿瘤细胞对TMZ易产生获得性耐药,患者中位生存期仍不足15个月^[2]。因此,探索联合策略以提高TMZ疗效、克服耐药,已成为GBM治疗领域的重要研究方向。

近年来,铁死亡作为一种以铁依赖性脂质过氧化积累为特征的程序性细胞死亡,因其与化疗敏感性密切相关而受到广泛关注^[3]。已有研究表明, TMZ可诱导GBM细胞发生铁死亡,促进其氧化损伤与线粒体功能紊乱,但由于铁死亡调控网络的复杂性,单药诱导往往存在效率低、应激反应激活等限制,提示联合干预可能更有效^[4]。其中,线粒体作为铁死亡发生的重要亚细胞器,其膜电位丧失、脂质过氧化与活性氧(ROS)积聚等改变,在GBM细胞凋亡与治疗敏感性调控中发挥关键作用^[5]。

西黄丸(Xihuang Pills, XHP)是中医抗肿瘤名方,源于清代《外科正宗》,主要由乳香、没药、牛黄与麝香等药物组成,具有软坚散结、清热解毒、活血化瘀的功效,广泛应用于多种实体瘤辅助治疗^[6-7]。现代药理研究证实, XHP可通过调控细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成与调节免疫微环境等多途径发挥抗肿瘤作用,但其是否可通过调控铁死亡途径,增强TMZ治疗GBM的疗效尚未见明确报道^[8]。核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)/谷

胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号轴是铁死亡的重要负向调控通路,其中Nrf2激活可诱导下游抗氧化防御系统表达,增强细胞对ROS与脂质过氧化的耐受性,进而抑制铁死亡^[9]。在GBM细胞中, Nrf2/HO-1/GPX4信号通路的高表达与TMZ耐药密切相关,因此靶向该通路抑制其活性,有望成为提高TMZ敏感性的新策略^[10]。

本研究拟基于Nrf2/HO-1/GPX4信号轴,探讨XHP是否通过诱导线粒体相关性铁死亡,增强TMZ对GBM细胞的杀伤效应。采用U251细胞模型,通过细胞活力、增殖、侵袭迁移、ROS生成、线粒体功能及关键蛋白表达等,综合评估XHP与TMZ的联合作用机制。该研究旨在为XHP作为TMZ联合用药提供实验依据,并为中药干预GBM耐药提供新的思路与策略。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF级雄性SD大鼠12只,体重200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[动物生产许可证号SCXK(湘)2022-0010]。大鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心动物房,适应性饲养7 d。环境温度控制在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 $50\% \pm 10\%$, 12 h光暗交替,常规饲料和水自由摄取,经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批号ZYFY2024082525)。GBM细胞(U251细胞,批号CL-0237)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物与试剂 XHP(批号19041276)购自北京同仁堂科技发展股份有限公司; TMZ(货号HY-

17364) 购自美国 MedChemExpress 公司; CCK-8 细胞活力检测试剂盒(货号 C0037)、EdU 细胞增殖检测试剂盒(货号 C0071S)、DCFH-DA ROS 检测试剂盒(货号 S0033S)、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(货号 C2006)、Mito-Tracker Green 线粒体荧光探针(货号 C1048) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; MitoSOX™ Red 线粒体 ROS 探针(货号 M36008) 购自美国 Invitrogen 公司; FerroOrange 亚铁离子(Fe^{2+}) 荧光探针(货号 GC19943) 购自上海宏叶生物科技有限公司; Mito-PeDPP 线粒体脂质过氧化探针(货号 M466) 购自日本同仁化学研究所; 谷胱甘肽(GSH) 检测试剂盒(货号 A006)、丙二醛(MDA) 检测试剂盒(货号 A003) 均购自南京建成生物工程研究所; RIPA 裂解液(货号 P0013B)、PMSF 蛋白酶抑制剂(货号 ST506)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 P0012) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; ECL 化学发光检测试剂盒(货号 1705061) 购自美国 Bio-Rad 公司; PVDF 膜(货号 IPVH00010) 购自德国 Millipore 公司; DAPI(货号 C1002) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 一抗包括兔抗 Nrf2(货号 ab92946)、兔抗 HO-1(货号 ab68477)、兔抗溶质载体家族成员 SLC7A11(xCT, 货号 ab37185)、兔抗 GPX4(货号 ab125066)、兔抗 β -actin(货号 ab8226) 购自英国 Abcam 公司; 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(货号 A0208) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器 酶标仪(美国 BioTek 公司, 型号 ELx800); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司, 型号 CKX53); 荧光显微镜(日本 Olympus 公司, 型号 IX73); 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司, 型号 TCS SP8); 电泳仪及转膜系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号 mini-PROTEAN Tetra system); 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司, 型号 5200 Multi); 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司, 型号 Nano-drop One); 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司, 型号 ML204); 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司, 型号 5424R); 透射电镜(TEM, 日本 Hitachi 公司, 型号 HT7800); 恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司, 型号 HH-4); 恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司, 型号 ZHWY-211C)。

2 方法

2.1 XHP 含药血清制备 12 只雄性 SD 大鼠随机

分为含药血清组和空白血清组, 每组 6 只。参照人体表面积标准换算系数(人 $K_m=37$, 大鼠 $K_m=6$), 换算比例为 6.17。成人每日口服 XHP 6 g(以 60 kg 体质量计, 折算为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。故大鼠等效基础剂量为 $617 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。考虑动物实验通常采用临床剂量 3 倍以保证药效显著性, 最终确定大鼠 XHP 灌胃剂量 $1851 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (即 $1.851 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。药物用 0.9% 生理盐水配制成适宜体积后, 按体质量计算灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 7 d, 制备 XHP 含药血清。末次灌胃 1 h 后, 2% 戊巴比妥麻醉, 采用腹主动脉采血法在无菌条件下收集全血, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血清, 56°C 水浴灭活补体 30 min, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 分装后 -80°C 保存备用。

2.2 CCK-8 检测细胞活力 采用 CCK-8 法筛选 TMZ 及 XHP 含药血清对 U251 细胞的适宜干预浓度, 并评估其协同抑制效应。将处于对数生长期的 U251 细胞以每毫升 5×10^4 个密度接种于 96 孔板, 每孔接种 $100 \mu\text{L}$, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换药物处理培养基。

TMZ 剂量筛选方面, 分别予 0、12.5、25、50、100、150、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 干预, 每剂量设 3 个复孔, 干预 24 h 后加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂, 孵育 2 h, 450 nm 测定吸光度(A), 细胞存活率 = $(A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

XHP 含药血清浓度筛选方面, 设定 XHP 浓度为 0、2.5%、5%、10%、15%、20%, 每组设 3 个复孔, 总血清浓度统一为 20%。其中 20% 组直接使用含药血清, 低于 20% 组采用含药血清与空白血清按比例混合。干预 24 h 后加 CCK-8 试剂检测细胞存活率。

联合干预方面, 设置对照组、TMZ 单药组(25、50、100、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、XHP 含药血清单药组(2.5%、5%、10%、20%)、联合组(TMZ 不同浓度分别与 XHP 含药血清不同浓度联合), 每组 3 个复孔。药物联合干预 48 h 后加 CCK-8 试剂检测细胞存活率。进一步采用 SynergyFinder 在线平台(<https://synergyfinder.org/>)基于最高单药效应(HSA)模型进行联合指数分析, 绘制协同评分矩阵与热图, 评估 XHP 含药血清对 TMZ 治疗 U251 细胞的增敏作用^[11]。

2.3 分组及处理 根据 CCK-8 检测结果, 综合考虑单药抑制效应及协同增敏作用, 选取 10% XHP

含药血清与 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 联合干预作为后续机制研究。U251 细胞根据处理方式分为 4 组: 对照组(10%空白血清)、XHP 组(10% XHP 含药血清)、TMZ 组($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ)、XHP+TMZ 组(10% XHP 含药血清+ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ), 各组细胞在对应处理条件下干预 24 h 后进行后续实验。

2.4 EdU 检测细胞增殖 将对数生长期 U251 细胞以每毫升 5×10^4 个接种于 24 孔板, 每孔 $500 \mu\text{L}$, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换处理培养基, U251 细胞分组处理后更换为含 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EdU 的无血清培养基, 继续孵育 2 h。随后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗涤, 0.5% Triton X-100 处理细胞 20 min 后进行 Click 反应体系标记 EdU 阳性细胞, 避光孵育 30 min, 再用 Hoechst 33342 染色细胞核。PBS 洗涤后使用荧光显微镜采集图像, 分别记录 DAPI 通道(细胞核)与 EdU 通道(增殖细胞), 计算 EdU 阳性率, 以评估细胞增殖水平。

2.5 克隆形成实验检测细胞长期增殖能力 将对数生长期 U251 细胞以每孔 500 个接种于 6 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换处理培养基。U251 细胞分组处理后更换为新鲜完整培养基, 继续培养 14 d, 每 3 d 更换 1 次培养基。待克隆斑点肉眼可见(单个克隆细胞团>50 个细胞)时, 弃去培养基, PBS 轻柔洗涤 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min 后结晶紫染色 30 min。染色完成后流水冲洗多余染料, 晾干后拍照记录。使用 ImageJ 软件对克隆小体进行计数, 以评估细胞的长期增殖能力。

2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭 将对数生长期 U251 细胞以每毫升 1×10^5 个悬液准备好后接种于 Transwell 小室上室, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换处理培养基。U251 细胞分组处理后收集各组细胞, 重悬于无血清培养基, 每孔上室加入含细胞悬液 $100 \mu\text{L}$, 铺有 Matrigel 基质(预先 1:8 稀释并铺板)的小室, 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% 胎牛血清的完全培养基作为吸引源。置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h 后弃去上室未迁移细胞, 用棉签轻轻擦除, PBS 洗涤 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min 后结晶紫染色 30 min。染色完成后流水冲洗去除多余染料, 晾干后拍照记录。使用 ImageJ 软件对穿膜细胞进行计数, 计算侵袭细胞数, 以评估细胞侵袭能力。

2.7 划痕实验检测细胞迁移 将对数生长期 U251 细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板, 37°C 、5% CO_2

培养至单层细胞融合度 90% 以上。使用无菌枪头在细胞单层中央垂直划痕, 去除脱落细胞后 PBS 轻柔洗涤 2 遍, 随后更换处理培养基。U251 细胞分组处理后, 倒置显微镜拍照记录 0 h 时划痕宽度, 培养 24 h 后再次拍照记录划痕宽度。使用 ImageJ 软件测量划痕区域, 计算细胞迁移率[迁移率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times 100\%$], 以评估细胞迁移能力。

2.8 FerroOrange 荧光探针检测细胞内 Fe^{2+} 水平 将对数生长期 U251 细胞以每孔 3×10^4 个接种于含玻片的 24 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换处理培养基, 继续孵育 24 h。处理结束后弃去培养基, PBS 轻柔洗涤 2 遍, 随后每孔加入 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ferro-Orange 工作液(预先用甲醇溶解并稀释于无血清培养基), 于 37°C 、5% CO_2 条件下避光孵育 30 min。染色结束后于荧光显微镜下采集图像(激发波长 488 nm、发射波长 572 nm)。使用 ImageJ 软件对红色荧光强度进行定量分析, 以评估细胞内 Fe^{2+} 水平, 以此反映铁死亡相关的生物学过程。

2.9 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 水平 将对数生长期 U251 细胞以每孔 3×10^4 个接种于含无菌爬片的 24 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换处理培养基, 持续干预 24 h。处理结束后弃去培养基, PBS 洗涤 2 遍, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 工作液(以无血清培养基稀释), 37°C 避光孵育 30 min。染色结束后再用 PBS 洗涤 3 次, 去除未进入细胞的探针。ROS 氧化 DCFH 生成具有绿色荧光的 DCF 产物。在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察并采集图像(激发波长 488 nm、发射波长 525 nm)。使用 ImageJ 软件对绿色荧光强度进行定量分析, 以评估细胞内 ROS 水平。

2.10 比色法检测细胞内 GSH、MDA 水平 将对数生长期 U251 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板, 处理 24 h 后用预冷 PBS 洗涤 2 遍, 刮取细胞后收集于 EP 管, 加入适量裂解液充分裂解。裂解产物于 4°C 、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液用于后续检测。GSH 检测依据试剂盒说明书, 在反应体系中 GSH 与 DTNB 反应生成黄色产物 TNB, 于 412 nm 处测定 A, 计算 GSH 含量。MDA 检测采用硫代巴比妥酸(TBA)法, MDA 与 TBA 在高温酸性条件下反应生成红色产物, 于 532 nm 处测定 A, 计算 MDA 含量, 以评估氧化应激水平。

2.11 TEM 观察细胞线粒体超微结构 将对数生长期 U251 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换不同处理培养基, 继续孵育 24 h。处理结束后弃去培养基, PBS 轻柔洗涤 2 遍, 收集细胞于 EP 管, 离心去上清液。细胞沉淀立即用 2.5% 戊二醛固定液于 4°C 下固定 12 h。随后 PBS 洗涤 3 次, 每次 15 min, 再用 1% OsO_4 固定 1.5 h 以增强膜结构对比度。经 30%~100% 乙醇梯度脱水后分别用丙酮脱水 2 次, 每次 15 min。将样品置于环氧树脂与丙酮的混合液(1:1) 渗透 1 h, 再转入纯环氧树脂于室温渗透过夜。经 60°C 聚合 48 h, 使用超薄切片机制备厚度约 70 nm 的超薄切片, 并置于铜网载网上, 依次用醋酸铀和柠檬酸铅染色以增强电子密度对比。在 TEM 下拍摄, 观察线粒体形态、嵴结构及膜完整性等特征, 评估细胞内线粒体结构变化, 以反映铁死亡相关的线粒体损伤程度。

2.12 JC-1 荧光探针检测细胞内线粒体膜电位 将对数生长期 U251 细胞以每孔 3×10^4 个接种于含玻片的 24 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换不同处理培养基, 继续孵育 24 h。处理结束后弃去培养基, PBS 轻柔洗涤 2 遍。随后每孔加入含 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ JC-1 探针的工作液, 37°C 、5% CO_2 条件下避光孵育 20 min。染色结束后用预冷 PBS 洗涤 2 次以去除多余染料。在线粒体膜电位正常时, JC-1 聚集于线粒体基质中形成聚集体, 呈红色荧光($\text{Ex}/\text{Em} = 525/590 \text{ nm}$); 在线粒体膜电位下降时, JC-1 以单体形式存在于胞质, 呈绿色荧光($\text{Ex}/\text{Em} = 490/530 \text{ nm}$)。通过荧光显微镜采集红、绿荧光图像, 使用 ImageJ 软件对红色和绿色荧光强度进行定量分析, 计算红/绿荧光比值, 评估细胞线粒体膜电位的相对变化, 以反映线粒体功能状态和铁死亡等细胞损伤。

2.13 Mito-PeDPP 荧光探针检测细胞线粒体内脂质过氧化水平 Mito-PeDPP 是一种新型线粒体靶向脂质过氧化探针, 可通过其三苯基膦阳离子部分跨膜进入线粒体, 用于评估线粒体脂质过氧化水平。将对数生长期 U251 细胞以每孔 3×10^4 个接种于含玻片的 24 孔板, 置于 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换为不同处理培养基, 继续孵育 24 h。处理结束后弃去培养基, PBS 轻柔洗涤 2 遍。随后每孔加入含 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mito-PeDPP 的工作液, 于 37°C 、5% CO_2 条件下避光孵育 30 min。染色结束后用 PBS 轻柔洗涤 2 次以去除多余染料。Mito-PeDPP 荧光

探针可靶向线粒体脂质膜, 特异性检测脂质过氧化产物, 过氧化水平越高, 其荧光信号越强。该探针在激发波长 470 nm、发射波长 525 nm 下发绿色荧光。通过荧光显微镜采集图像, 使用 ImageJ 软件对绿色荧光强度进行定量分析, 评估细胞线粒体脂质过氧化水平, 以反映线粒体相关铁死亡程度。

2.14 Mito-Tracker Green 和 MitoSOXTM Red 荧光染料检测细胞线粒体形态结构和过氧化水平 Mito-Tracker Green 是一种经典的线粒体膜潜能非依赖性探针, 可稳定结合于线粒体膜脂质, 用于直观反映线粒体的分布、数量及形态结构; MitoSOXTM Red 是一种特异性靶向线粒体的超氧阴离子探针, 用于检测线粒体内源性 ROS 水平。将对数生长期 U251 细胞接种于含玻片的 24 孔板, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h 后更换为不同处理培养基, 继续孵育 24 h。处理结束后弃去培养基, PBS 轻柔洗涤 2 次。配制终浓度为 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Mito-Tracker Green 染色工作液(由 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMSO 储备液按 1:5 000 稀释于含钙镁 HBSS 中), 加至各组细胞中, 37°C 、5% CO_2 条件下避光孵育 30 min。染色结束后轻柔洗涤, PBS 清除游离探针。继续配制终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MitoSOXTM Red 染色工作液(由 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液按 1:1 000 现配于 PBS 中), 加入细胞孔, 37°C 避光孵育 30 min。孵育完成后再次用 PBS 轻柔洗涤 2 遍。染色结束后在激光共聚焦荧光显微镜下采集绿色荧光(Mito-Tracker Green, $\text{Ex}/\text{Em} = 490/516 \text{ nm}$) 与红色荧光(MitoSOXTM Red, $\text{Ex}/\text{Em} = 510/580 \text{ nm}$) 图像。使用 ImageJ 软件对红色荧光进行荧光强度定量分析, 评估线粒体超氧化物水平, 以反映线粒体功能状态及其在铁死亡过程中的作用。

2.15 蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测细胞内铁死亡相关蛋白表达 将对数生长期 U251 细胞接种于 6 孔板, 各组处理 24 h 后, 用 RIPA 裂解液(含 1% PMSF 蛋白酶抑制剂) 冰上裂解细胞 30 min, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量后, 按每孔 30 μg 蛋白量加载于 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离, 随后转膜至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 1 h, 分别加入一抗 [Nrf2 (1:2 000)、HO-1 (1:2 000)、xCT (1:3 000)、GPX4 (1:4 000)] 和内参 β -actin (1:5 000), 4°C 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次(每次 10 min), 加入 HRP 标记的二抗 (1:8 000), 室温孵

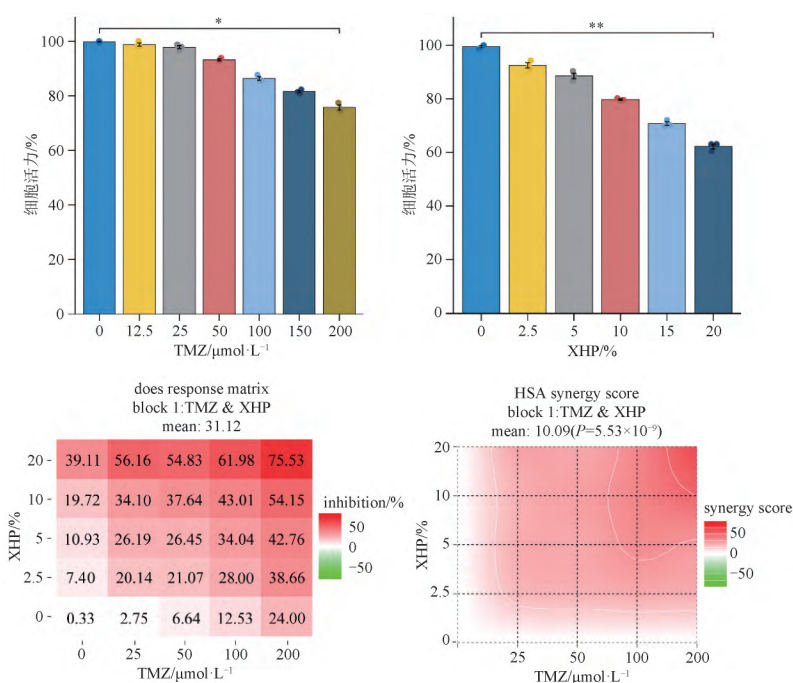
育 1 h 后再次洗膜。使用 ECL 显色试剂显色,并用凝胶成像系统获取蛋白条带。通过 ImageJ 软件对条带灰度进行分析,计算各靶蛋白相对表达量,以 β -actin 为内参进行标准化。

2.16 统计分析 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),若差异有统计学意义($P<0.05$),进一步采用 LSD 法进行组间两两比较。不满足方差齐性或正态分布的数据,采用非参数检验进行分析。采用 R 语言进行数据可视化,使用 ggplot2 包绘制柱状图,主要使用 geom_

bar() 和 geom_errorbar() 等函数实现;组间差异比较及显著性标注通过 ggpubr 包中的 stat_compare_means() 等函数实现。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 XHP 增敏 TMZ 协同抑制 U251 细胞活力 CCK-8 法检测显示, TMZ 呈浓度依赖性抑制 U251 细胞活力,与对照组(0)比较, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 对细胞活力明显抑制($P<0.05$) (图 1)。同样地, XHP 呈浓度依赖性抑制 U251 细胞活力,与对照组(0)比较, 20% XHP 对细胞活力明显抑制($P<0.01$) (图 1)。



TMZ:替莫唑胺; XHP:西黄丸; 2 组比较* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (图 2、3 同)。

图 1 替莫唑胺与西黄丸对 U251 细胞活力的抑制作用及协同效应($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

Fig.1 Inhibitory effects of temozolomide and Xihuang Pills on viability of U251 cells and their synergistic interaction($\bar{x}\pm s$ $n=3$)

在单药处理基础上,评估 TMZ 与 XHP 联合干预 U251 细胞的抑制效应,联合处理 24 h 后细胞活力呈更明显的下降趋势。剂量依赖性热图显示, TMZ+XHP 组细胞抑制率整体高于单药组,且随着 TMZ 和 XHP 浓度的增加,抑制效应增强(图 1)。HSA 模型分析协同效应显示,整体协同评分均为正值(mean synergy score=10.09 $P=5.53\times 10^{-9}$),提示联合干预在大部分剂量组合下存在良好的协同抑制作用(图 1)。其中,高剂量 TMZ 与高浓度 XHP 联合时协同效应最显著,进一步证实 XHP 能够增敏

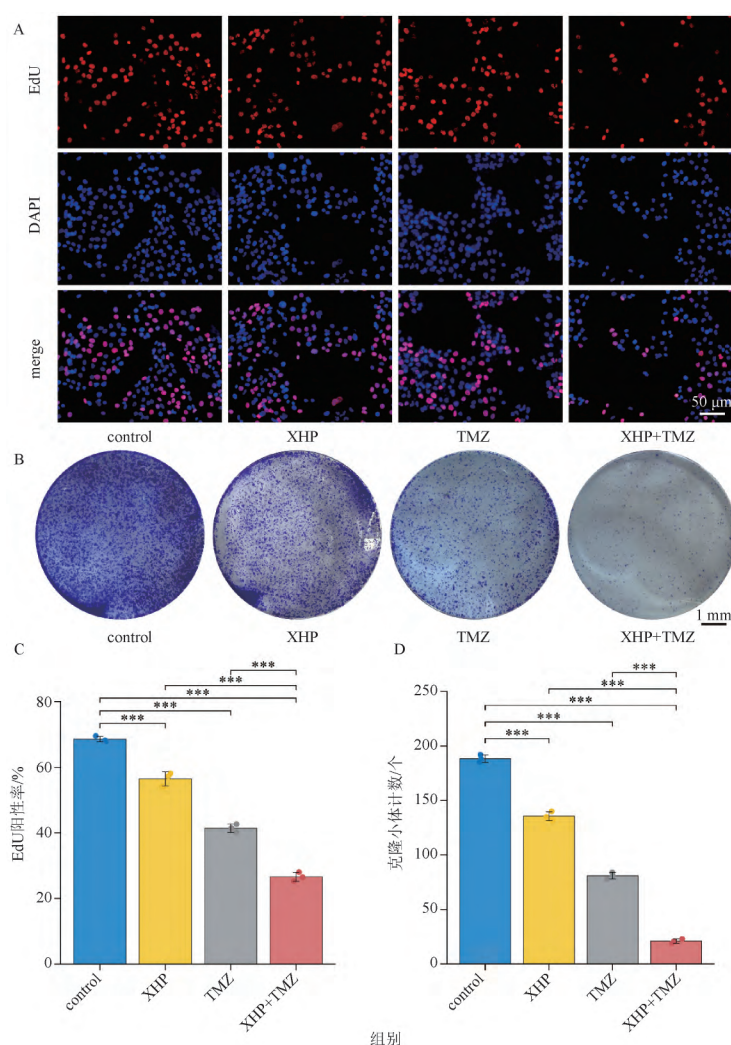
TMZ 对 U251 细胞的治疗效果。

综合考虑单药抑制效应及协同增敏作用,10% XHP 含药血清在单药处理时对细胞活力具有一定抑制作用,但尚未达到最大抑制水平,具有进一步增强治疗效果的空间;200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 则为细胞活力下降具有统计学意义的有效剂量。同时,协同效应分析可见,10% XHP 含药血清+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 联合干预时协同评分较高,提示两者联合具有良好的治疗潜力。因此,后续实验采用 10% XHP+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMZ 联合处理 U251 细胞,探讨其协

同抗肿瘤机制。

3.2 XHP 增敏 TMZ 协同抑制 U251 细胞增殖
EdU 检测显示,与对照组相比,XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞 EdU 阳性率明显降低($P<0.001$),其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞 EdU 阳性率显著低于单药组($P<0.001$)。克隆形成实验检测

显示,与对照组比较,XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞克隆小体计数显著减少($P<0.001$),其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞克隆小体计数显著低于单药组($P<0.001$) (图 2)。结果表明,XHP 增敏 TMZ 在长期抑制细胞增殖方面具有更强的协同作用。



A. EdU 染色检测细胞 DNA 合成活性(红色为 EdU 阳性,蓝色为 DAPI 核染色); B. 克隆形成实验检测细胞长期增殖能力; C. EdU 阳性率; D. 克隆小体计数。control. 对照组(10% 空白血清); XHP. 10% XHP 含药血清组; TMZ. $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组; XHP+TMZ. 10% XHP 含药血清+ $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组(图 3~7 同)。

图 2 西黄丸增敏替莫唑胺协同抑制 U251 细胞增殖能力($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.2 Xihuang Pills sensitizes temozolomide and synergistically inhibits the proliferation ability of U251 cells ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

3.3 XHP 增敏 TMZ 协同抑制 U251 细胞侵袭和迁移
Transwell 实验显示,与对照组相比,XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞侵袭数明显降低($P<0.05$, $P<0.001$),其中 XHP+TMZ 组 U251

细胞侵袭数显著低于单药组($P<0.001$)。细胞划痕实验检测显示,与对照组相比, TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞迁移率明显降低($P<0.05$, $P<0.001$),其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞迁移率显著

低于单药组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$) (图 3)。结果表明, XHP 增敏 TMZ 在短期内协同抑制 U251 细胞

的侵袭与迁移, 提示联合干预策略在 GBM 抗侵袭治疗中具有潜在优势。

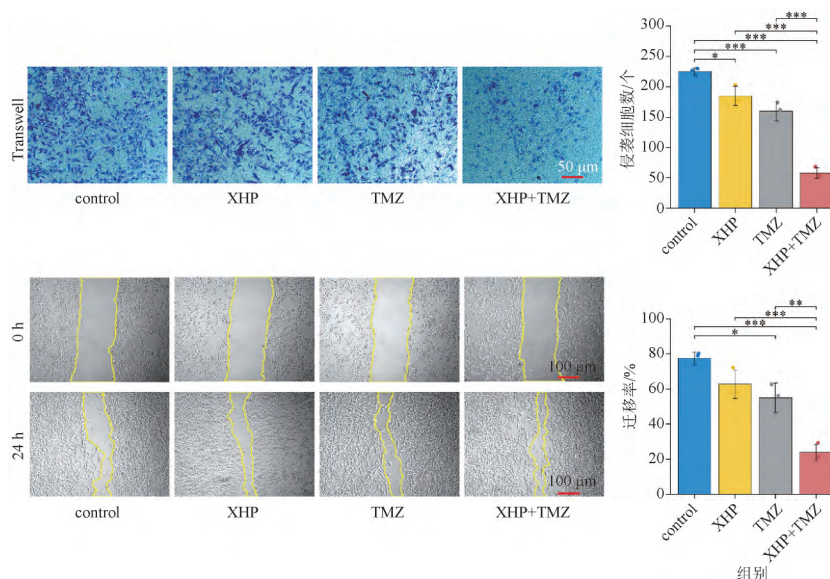


图 3 西黄丸增敏替莫唑胺协同抑制 U251 细胞侵袭与迁移能力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.3 Xihuang Pills sensitizes temozolomide and synergistically inhibits the invasion and migration of U251 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 XHP 增敏 TMZ 协同诱导 U251 细胞铁死亡

FerroOrange 染色显示, 与对照组相比, TMZ 组、XHP + TMZ 组 U251 细胞内 Fe^{2+} 水平上调 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内 Fe^{2+} 水平上调高于单药组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 4)。DCFH-DA 荧光探针检测显示, 与对照组相比, TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞内 ROS 水平上调 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内 ROS 水平上调高于单药组 ($P < 0.05$) (图 4)。比色法检测显示, 与对照组相比, XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞内 GSH 与 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内 GSH 与 MDA 含量降低优于单药组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 4)。结果表明, XHP 可增强 TMZ 诱导的 Fe^{2+} 积累, 升高氧化应激水平及脂质过氧化, 提示其通过调控铁死亡过程协同增强 TMZ 对 U251 细胞的杀伤效应。

3.5 XHP 增敏 TMZ 协同诱导 U251 细胞内线粒体结构和功能损伤 TEM 观察显示, 对照组 U251 细胞线粒体结构完整、嵴清晰; XHP 组略有肿胀, 部分嵴结构轻度紊乱; TMZ 组线粒体明显肿胀、嵴断裂, 提示其诱导线粒体结构损伤; XHP+TMZ 组细胞内

线粒体呈严重肿胀变性状态, 嵴消失, 膜结构模糊, 线粒体损伤最严重, 提示 XHP 可协同 TMZ 加重线粒体超微结构破坏 (图 5)。JC-1 荧光染色检测显示, 对照组 U251 细胞以红色荧光为主, 提示线粒体膜电位较高。与对照组相比, XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞内红/绿荧光强度比降低 ($P < 0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内红/绿荧光强度比降低优于单药组 ($P < 0.001$) (图 5)。综上, XHP 可协同增强 TMZ 诱导的 U251 细胞线粒体结构破坏与膜电位丧失, 提示其通过干扰线粒体功能进一步增敏 TMZ 的线粒体毒性效应。

3.6 XHP 增敏 TMZ 协同诱导 U251 细胞内线粒体脂质过氧化 Mito-PDPP 荧光染色显示, 与对照组相比, XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞内线粒体脂质过氧化水平降低, 平均荧光强度升高 ($P < 0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内线粒体平均荧光强度升高优于单药组 ($P < 0.01$, $P < 0.001$) 提示 XHP 可协同增强 TMZ 诱导的线粒体脂质过氧化水平 (图 6)。Mito-Tracker Green/MitoSOXTM Red 双荧光染色显示, 对照组细胞线粒体分布均匀, 形态规则; XHP 组线粒体略有膨胀, 分布较为集中; TMZ 组则出现明显的线粒体肿胀与团聚,

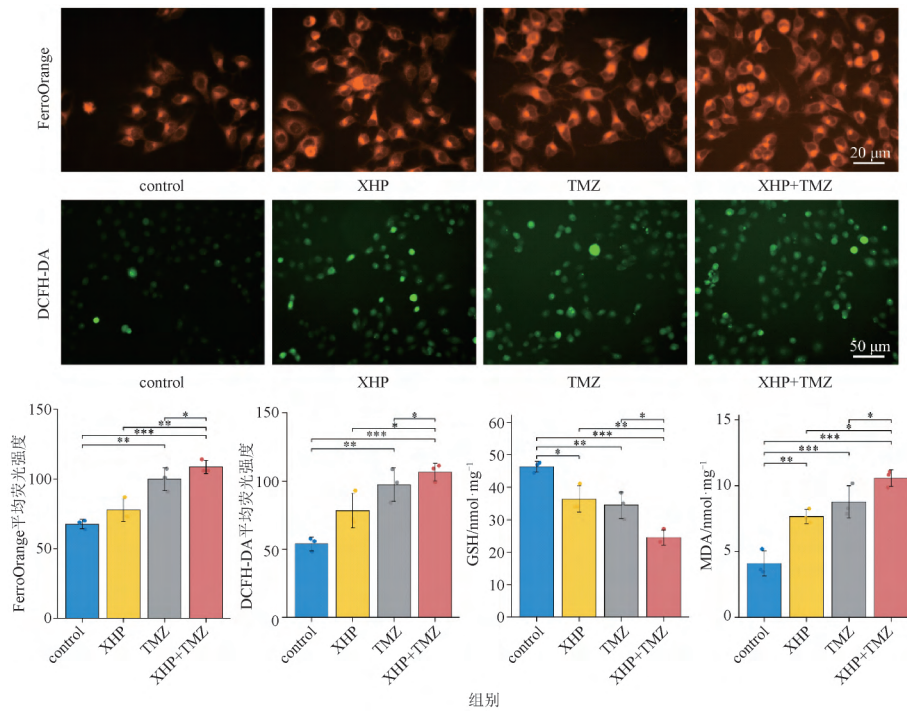


图 4 西黄丸增敏替莫唑胺协同诱导 U251 细胞铁死亡相关指标变化 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.4 Xihuang Pills sensitizes temozolomide synergistically induces changes in ferroptosis-related indicators in U251 cells ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

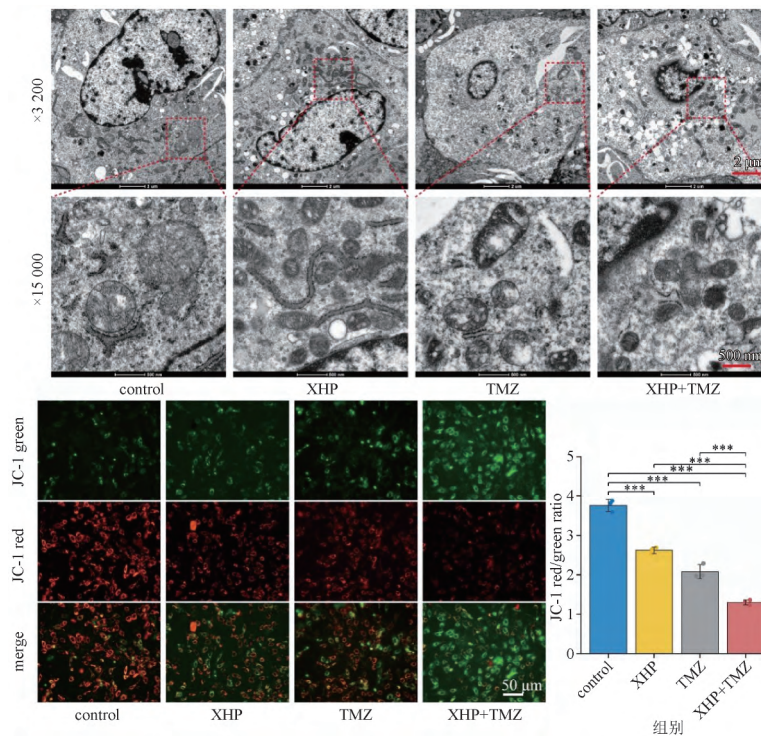


图 5 西黄丸增敏替莫唑胺协同诱导 U251 细胞线粒体结构破坏与膜电位损伤 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.5 Xihuang Pills sensitizes temozolomide synergistically induces mitochondrial structural disruption and membrane potential injury in U251 cells ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

提示结构紊乱; XHP+TMZ 组线粒体呈现显著膨胀、融合状态,边界模糊,结构破坏最为严重。与对照组相比, XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞内 ROS 水平上升 ($P<0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内 ROS 水平上升优于单

药组 ($P<0.001$) (图 6)。综上, XHP 可显著增强 TMZ 诱导 U251 细胞线粒体脂质过氧化与 ROS 积聚, 并加重线粒体形态破坏, 提示其通过干扰线粒体结构与功能进一步增敏 TMZ 的线粒体毒性效应。

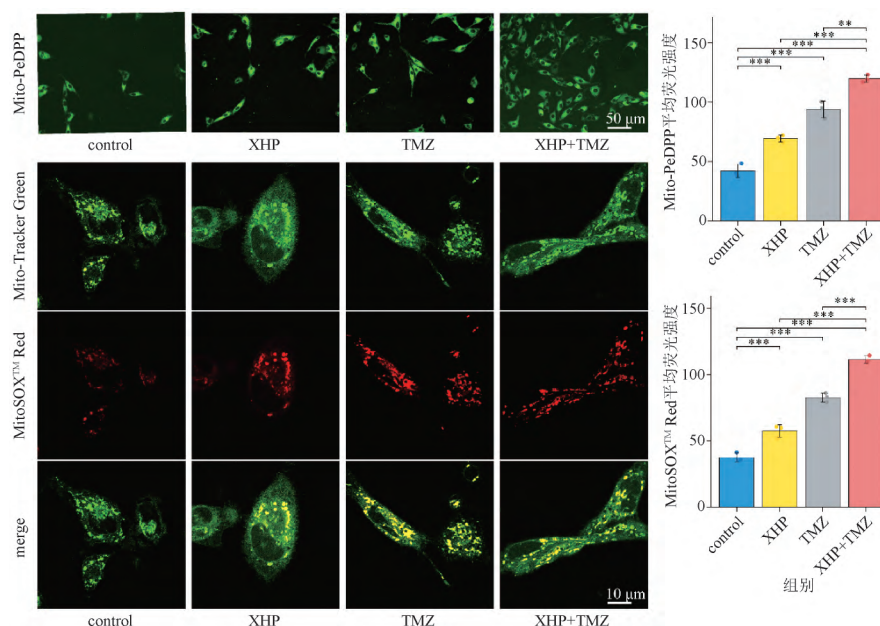


图 6 西黄丸增敏替莫唑胺诱导 U251 细胞线粒体脂质过氧化和 ROS 积聚 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.6 Xihuang Pills sensitizes temozolomide synergistically induces mitochondrial lipid peroxidation and ROS accumulation in U251 cells ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

3.7 XHP 增敏 TMZ 协同调控 U251 细胞内 Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴蛋白表达 Western blot 检测显示, 与对照组相比, XHP 组、TMZ 组、XHP+TMZ 组 U251 细胞内 Nrf2、HO-1、xCT 及 GPX4 蛋白表达显著下调 ($P<0.05$, $P<0.001$), 其中 XHP+TMZ 组 U251 细胞内 Nrf2、HO-1、xCT 及 GPX4 蛋白表达下调优于单药组 ($P<0.001$) (图 7)。综上所述, XHP 可协同 TMZ 抑制 U251 细胞 Nrf2/HO-1/GPX4 抗氧化及铁死亡保护通路的激活, 提示可能是其增强 TMZ 诱导铁死亡的关键作用机制之一。

4 讨论

GBM 为临床常见的中枢神经系统高级别恶性肿瘤, 具有发展迅速、侵袭性强且对现有放疗化疗手段反应有限的特点, 是当前脑肿瘤治疗的重大难题^[12]。TMZ 作为一线化疗药物, 虽有一定的细胞毒性, 但其疗效易受肿瘤异质性、化疗耐药等因素限制^[13]。研究发现, 肿瘤细胞对氧化应激的适应性是

诱发耐药的重要机制之一, 而铁死亡作为一种新型的细胞死亡, 因其高度依赖铁离子积累和脂质过氧化损伤, 成为克服肿瘤耐药性的潜在策略^[14]。

GBM 可归属于“癰疽”“瘤积”“头风”等范畴, 其发生多由肝风内动、痰浊瘀阻、阴阳失调等因素共同导致^[15]。《黄帝内经》有云“正气存内, 邪不可干”, 指出正虚为本、邪实为标的辨证基础^[16]。“毒”邪久郁化热, 耗伤气阴, 肝肾亏虚, 髓海失养, 尤易形成肿瘤“痰瘀夹毒”病理状态。《外科正宗》亦载“瘀毒凝结, 结而成积”, 为 GBM 的中医病因提供理论支撑^[17]。XHP 由乳香、没药、牛黄等药物组成, 兼具化瘀散结、清热解毒、通络止痛之效, 历代用于多种实体瘤的中医治疗, 现代药理研究亦证实其具有抗增殖、促凋亡及抗转移等多种抗肿瘤活性^[18]。

本研究在细胞水平证实, XHP 可通过诱导线粒体相关铁死亡, 协同增强 TMZ 的细胞毒性作用。结

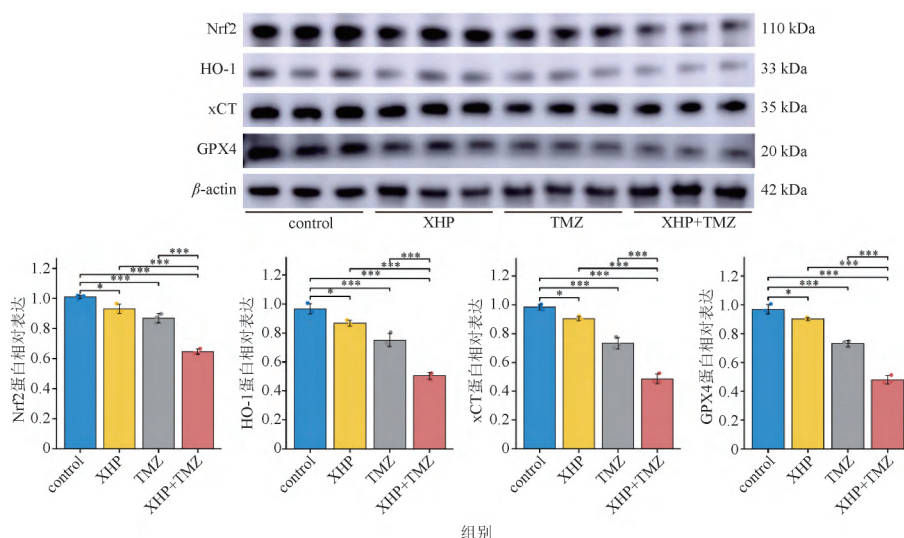


图 7 西黄丸增敏替莫唑胺抑制 U251 细胞 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路蛋白表达($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.7 Xihuang Pills sensitizes temozolomide and inhibits protein expression of Nrf2/HO-1/GPX4 signaling pathway in U251 cells ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

果显示,XHP+TMZ 组显著抑制 U251 细胞的增殖、克隆形成能力,并抑制其迁移与侵袭潜能,提示两药联用具有良好的抗肿瘤协同效应。细胞形态和 TEM 观察显示,XHP+TMZ 组线粒体出现肿胀、嵴断裂、膜结构破坏,伴随 JC-1 荧光强度下降,Mito-Tracker Green 染色信号减弱,MitoSOX 和 Mito-PeDPP 染色强度增强,显示线粒体膜电位去极化及氧化损伤加剧,符合线粒体相关性铁死亡特征。进一步分析发现,XHP+TMZ 组细胞内游离 Fe^{2+} 、总 ROS 及脂质过氧化物(MDA、LPO)水平显著上调,提示细胞氧化还原失衡。抗氧化方面,GPX4 及其合成所需的 GSH 含量显著下降,且伴随 Nrf2、HO-1、xCT 等关键抗氧化蛋白表达的下调,表明联合处理可破坏 Nrf2/HO-1/GPX4 抗氧化通路稳定性,从而进一步促进铁死亡过程的发生。

Nrf2 信号轴作为维持氧化还原稳态的重要通路,其通过上调 HO-1、GPX4、xCT 等下游分子调控抗氧化应激与铁稳态^[19]。已有研究证实,Nrf2 的持续激活是肿瘤细胞逃避铁死亡与抗药性的重要机制之一^[20]。研究发现,XHP+TMZ 组该通路受抑显著,提示 XHP 可能通过靶向破坏 Nrf2 信号轴,削弱细胞自我保护能力,进而增强 TMZ 诱导的细胞死亡效应。乳香中的 β -没药烯、牛黄中的胆酸类成分具有协同调控 ROS 生成、促进凋亡、抗炎、抗氧化等多重作用,可能通过作用于 Nrf2 实现“扶正祛邪”的综合

效应,表现出典型的中药多靶点干预特征^[21-23]。此外,XHP 中的诸多成分还可通过调节线粒体膜通透性、调控 Fe^{2+} 转运、增强脂质过氧化等多个环节促进铁死亡过程,为其在 TMZ 化疗中的增敏机制提供了药理学依据。

综上所述,XHP 可通过协同抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 抗氧化信号通路,破坏线粒体结构完整性与功能,诱导线粒体相关铁死亡,从而增强 TMZ 对 GBM 的细胞毒性作用。该研究为 XHP 临床联合化疗提供了理论基础,也为中医药干预耐药性恶性肿瘤提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] PASUPULETI V, VORA L, PRASAD R, et al. Glioblastoma preclinical models: strengths and weaknesses [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2024, 1879(1): 189059.
- [2] SINGH N, MINER A, HENNIS L, et al. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma: a comprehensive review [J]. Cancer Drug Resist, 2021, 4(1): 17.
- [3] LEI G, ZHUANG L, GAN B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(7): 381.
- [4] JEZIERZAŃSKI M, NAFALSKA N, STOPYRA M, et al. Temozolomide (TMZ) in the treatment of glioblastoma multiforme: a literature review and clinical outcomes [J]. Curr Oncol, 2024, 31(7): 3994.
- [5] LAN Y, YANG T, YUE Q, et al. IRP1 mediated ferroptosis reverses temozolomide resistance in glioblastoma via affecting LCN2/FPN1 signaling axis depended on NFKB2 [J]. iScience, 2024, 27(12): 108111.

- 2023 , 26(8) : 107377.
- [6] 王俊亮, 马学莉, 陶蕊, 等. 西黄丸活性成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024 , 30(22) : 259.
- [7] 龙衍, 罗新筠, 邹博, 等. 基于 FAK/Src/ERK 通路探讨西黄丸对前列腺癌血管生成、侵袭和转移的影响 [J]. 中国中药杂志, 2024 , 49(23) : 6378.
- [8] XU H B , CHEN X Z , ZHU S Y , et al. A study on molecular mechanism of Xihuang Pill in the treatment of glioblastoma based on network pharmacology and validation *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol , 2024 , 323: 117675.
- [9] LEE J , ROH J L. Targeting Nrf2 for ferroptosis-based therapy: implications for overcoming ferroptosis evasion and therapy resistance in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis , 2023 , 1869(7) : 166788.
- [10] ALMEIDA L K , OSAWA I Y A , RAMALHO M C C , et al. Temozolomide resistance in glioblastoma by Nrf2: protecting the evil [J]. Biomedicines , 2023 , 11(4) : 1081.
- [11] DHUNGEL L , ROWSEY M E , HARRIS C , et al. Synergistic effects of temozolomide and doxorubicin in the treatment of glioblastoma multiforme: enhancing efficacy through combination therapy [J]. Molecules , 2024 , 29(4) : 840.
- [12] TOMAR M S , KUMAR A , SRIVASTAVA C , et al. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer , 2021 , 1876(2) : 188616.
- [13] 何婧怡, 胡春宏. 替莫唑胺治疗胶质母细胞瘤耐药机制的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019 , 36(23) : 3001.
- [14] SONG Q , PENG S , SUN Z , et al. Temozolomide drives ferroptosis via a DMT1-dependent pathway in glioblastoma cells [J]. Yonsei Med J , 2021 , 62(9) : 843.
- [15] 海市中西医结合学会神经外科专业委员会. 脑胶质瘤中西医结合临床诊疗专家共识(上海) [J]. 上海中医药大学学报, 2023 , 37(5) : 1.
- [16] 黄帝内经(上下) [M]. 姚春鹏译注. 北京: 中华书局, 2022.
- [17] 李中梓. 医宗必读 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [18] TANG N , GENG N , ZHU X. Evaluation of Xihuang Pill in inducing pyroptosis in glioma cells through modulation of miR-21-5p [J]. 3 Biotech , 2024 , 14(12) : 295.
- [19] YAN R , LIN B , JIN W , et al. Nrf2 , a superstar of ferroptosis [J]. Antioxidants , 2023 , 12(9) : 1739.
- [20] YANG R , WANG Z , JIAN H , 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.
- [21] PENG D , LU H , ZHU S , et al. Nrf2 antioxidant response protects against acidic bile salts-induced oxidative stress and DNA damage in esophageal cells [J]. Cancer Lett , 2019 , 458: 46.
- [22] OROZCO-AGUILAR J , SIMON F , CABELLO-VERRUGIO C. Redox-dependent effects in the physiopathological role of bile acids [J]. Oxid Med Cell Longev , 2021 , 2021: 4847941.
- [23] ZHOU C , WANG Y , ZHANG Q , et al. Acetyl-l-keto-beta-boswellic acid activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway in Schwann cells to reduce oxidative stress and promote sciatic nerve injury repair [J]. Planta Med , 2023 , 89(15) : 1468.

[责任编辑 张燕]