

生龙接骨胶囊对骨折大鼠 BMP-Smad 信号通路的影响

薛远亮
(山东中医药大学附属医院骨科, 山东 济南 250014)

摘要: **目的** 探讨生龙接骨胶囊对骨折大鼠 BMP-Smad 信号通路的影响。**方法** 将大鼠随机分为假手术组、模型组和生龙接骨胶囊组 (600 mg/kg), 建立胫骨骨折大鼠模型, 给药 4 周后, 苏木精和伊红 (HE) 染色评估骨折区域形态, 免疫组化染色检测骨折区域 Col- I 表达, Western blot 法检测骨折区域组织 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF 蛋白表达。制备生龙接骨胶囊含药血清, 以此处理成骨细胞, CCK-8 实验检测成骨细胞活力, 试剂盒检测 ALP 活性, RT-qPCR 法检测细胞 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF mRNA 表达。**结果** X 线片、HE 染色和 Col- I 免疫组化染色均显示生龙接骨胶囊促进了胫骨骨折愈合。与模型组比较, 生龙接骨胶囊组大鼠骨折区域组织 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)。与对照组比较, 生龙接骨胶囊含药血清组成骨细胞活力、ALP 活性和 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF mRNA 表达均升高 ($P<0.05$)。**结论** 生龙接骨胶囊可促进骨折愈合和成骨细胞形成, 其机制可能与 BMP-Smad 信号通路的激活有关。

关键词: 生龙接骨胶囊; 骨折; 骨形态发生蛋白; 成骨细胞; BMP-Smad 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)06-2007-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.044

骨折愈合包括炎症、成骨、愈伤组织形成和重塑等修复过程。目前, 许多药物在骨折愈合的早期阶段效果较差, 或者存在副作用。因此, 加速骨折愈合的新药开发非常重要。生龙接骨胶囊是南昌市洪都中医医院的院内制剂, 主要由三七、续断、当归、骨碎补、鸡血藤、生龙骨等 17 味中药组成^[1]。目前, 多项研究证实生龙接骨胶囊对骨不连、骨缺损具有良好的疗效^[2-3]。然而, 其具体作用机制尚不明确。骨形态发生蛋白 (BMP) 是 TGF- β 3 家族中的一种多功能生长相关因子, 主要分布于骨基质中^[4]。当 BMP 水平增加时, 可影响骨的形成, 从而增加骨密度, 达到促进骨愈合的目的。BMP 通过调节成骨相关基因的转录, 激活 Smads 蛋白信号转导发挥成骨作用。Smads 包含几种亚型, 其中 Smad1、Smad5 和 Smad8 是 BMP 的主要效应分子^[5]。本研究通过探讨生龙接骨胶囊对骨折大鼠骨形成和矿化的影响, 以及生龙接骨胶囊通过 BMP-Smad 信号通路诱导成骨细胞表达 BMPs 的机制, 为骨折的临床治疗提供借鉴。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 120 只, 7~8 周龄, 体质量 280~320 g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 2019-0003。饲养于山东大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2019-0005, 环境温度 23 ℃, 相对湿度 55%, 12 h/12 h 光/暗周期, 自由进食和饮水。本实验符合动物护理指南, 已获得山东大学实验动物中心动物实验伦理委员会批准 (伦

理号 20190011), 实验过程遵循 3R 原则。大鼠标准饲料购自山东艾莱克生物科技有限公司。

1.2 药物与试剂 生龙接骨胶囊 (批号 20170510) 由南昌市洪都中医院提供。苏木精和伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号 G1120) 购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) (货号 CK04) 购自日本同仁化学研究所; BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (货号 C3206) 购自上海碧云天生物技术有限公司; TRIzol 试剂 (货号 15596018) 购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶 (货号 C28025) 购自美国 Life Technologies 公司; SYBR Green Master Mix (货号 4913914001) 购自美国 Roche 公司; Collagen I (Col-I) (货号 ab34710)、BMP-2 (货号 ab214821)、Smad1 (货号 ab33902)、Smad4 (货号 ab230815)、RUNX-2 (货号 ab236639)、OSX (货号 ab229258)、GAPDH (货号 ab8245) 一抗和 HRP 标记的二抗 (货号 ab205718) 均购自英国 Abcam 公司; DAB 试剂盒 (货号 AR1025) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 双辛可宁酸蛋白质 (BCA) 测定试剂盒 (货号 C503021) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 仪器 BP121S 电子天平购自德国赛多利斯公司; 冰箱购自海尔集团公司; 紫外可见分光光度计购自日本岛津公司; 高压蒸汽灭菌锅购自青岛聚创环保集团有限公司; CFX96 实时 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 超低温冰箱、台式离心机购自美国 Thermo 公司。

收稿日期: 2022-03-10

基金项目: 山东省重点研发计划 (软科学项目) (2020RKBI4074)

作者简介: 薛远亮 (1972—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为小儿骨与关节创伤与疾病。E-mail: xlljn@163.com

2 方法

2.1 造模及给药 大鼠适应性饲养 1 周后，随机分为假手术组、模型组和生龙接骨胶囊组，每组 12 只。模型组和生龙接骨胶囊组参考文献 [6] 报道方法建立大鼠胫骨骨折模型，大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠（0.2 mL/kg）进行麻醉，右下肢剃毛消毒，于前外侧胫骨骨干中上 1/3 交界处切开皮肤 15 mm，暴露胫骨，将克氏针自胫骨下端逆行向上打入胫骨上端，穿出皮肤后钳断克氏针尾，再顺行打入胫骨干；肌肉与骨骼分离后，用手术钳在胫骨骨干中上 1/3 交界处切断胫骨，然后将伤口逐层缝合。假手术组大鼠仅暴露胫骨。建模完成后，假手术组和模型组大鼠每天灌胃 2 mL 生理盐水，生龙接骨胶囊组大鼠每天灌胃 600 mg/kg 生龙接骨胶囊溶液（2 mL），连续 4 周。给药结束后，收集大鼠心脏血液，解剖胫骨，每组取 6 只大鼠胫骨骨折区域组织进行 RNA 和蛋白质提取，另外 6 只用于组织学和免疫组化染色。

2.2 HE 染色观察胫骨组织病理变化 分离大鼠胫骨，4% 多聚甲醛固定 24 h，再置于 20% EDTA 溶液中脱钙 6 周，每周更换脱钙液，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋后切成 4 μm 切片，HE 染色观察胫骨组织病理变化。

2.3 免疫组化染色检测 Col- I 蛋白表达 将大鼠胫骨切片脱蜡和水化，3% H₂O₂ 浸泡 10 min，5% 牛血清白蛋白（BSA）封闭液封闭 2 h，将切片与 Col- I 一抗（1：200）4 ℃ 孵育过夜，次日与生物素标记二抗和链霉亲和素-生物素复合物（1：150）37 ℃ 孵育 30 min，DAB 试剂盒显色，苏木精复染。使用 Image-Pro Plus 5.0 软件计算阳性细胞的平均积分光密度（IOD）。

2.4 Western blot 法检测 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX 和 VEGF 蛋白表达 胫骨组织用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解，BCA 法测定蛋白浓度，通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质，然后转移到 PVDF 膜上，将膜与 BMP-2（1：1 000）、Smad1（1：1 000）、Smad4（1：1 000）、RUNX-2（1：2 000）、OSX（1：2 000）、GAPDH（1：2 000）一抗在 4 ℃ 孵育过夜，然后与 HRP 标记的二抗（1：2 000）室温孵育 2 h，使用 ECL 化学发光试剂盒显影，以 GAPDH 作为内参，计算目的蛋白相对表达。

2.5 含药血清制备 将大鼠随机分为对照组和生龙接骨胶囊组，每组 10 只，生龙接骨胶囊组灌胃给予 600 mg/kg 生龙接骨胶囊溶液，空白组灌胃给予生理盐水，连续 3 d。给药结束后，大鼠颈总动脉插管无菌取血，4 ℃、3 000 r/min 离心 30 min，分离血清，56 ℃ 水浴灭活 30 min，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，于-20 ℃ 保存，使用前用 DMEM 稀释成 10% 含药血清。

2.6 成骨细胞培养 1 日龄 SD 大鼠断头处死并分离颅盖骨，切碎后用 0.2% I 型胶原酶溶液消化。将成骨细胞以 2×10⁵/25 cm² 的密度接种至含完整培养基（高葡萄糖、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素和 10% 胎牛血清）的培养瓶中，于 37 ℃、5% CO₂ 下培养，每 3 d 更换 1 次培

养基。取第 3 代成骨细胞用于后续实验。

2.7 CCK-8 实验检测细胞活力 将成骨细胞以每孔 5×10⁴ 个的密度接种至 96 孔板中，培养 24 h。随后分为对照组和生龙接骨胶囊组，用 10% 含药血清或正常培养基处理 3 d 后，吸弃培养基，加入新鲜培养基和 CCK-8 试剂，孵育 1 h 后，通过多功能酶标仪在 450 nm 波长处检测光密度（OD）。

2.8 ALP 活性检测 将成骨细胞以每孔 2×10⁵ 个的密度接种至 6 孔板中，培养 24 h，用 10% 含药血清或正常培养基处理 3 d 后，使用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒检测 ALP 活性。

2.9 RT-qPCR 法检测 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，紫外可见分光光度计检测 RNA 浓度，逆转录后于 PCR 仪进行 RT-qPCR 反应。反应条件为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环。每个样品重复检测 3 次，通过 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对表达量。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，序列见表 1。

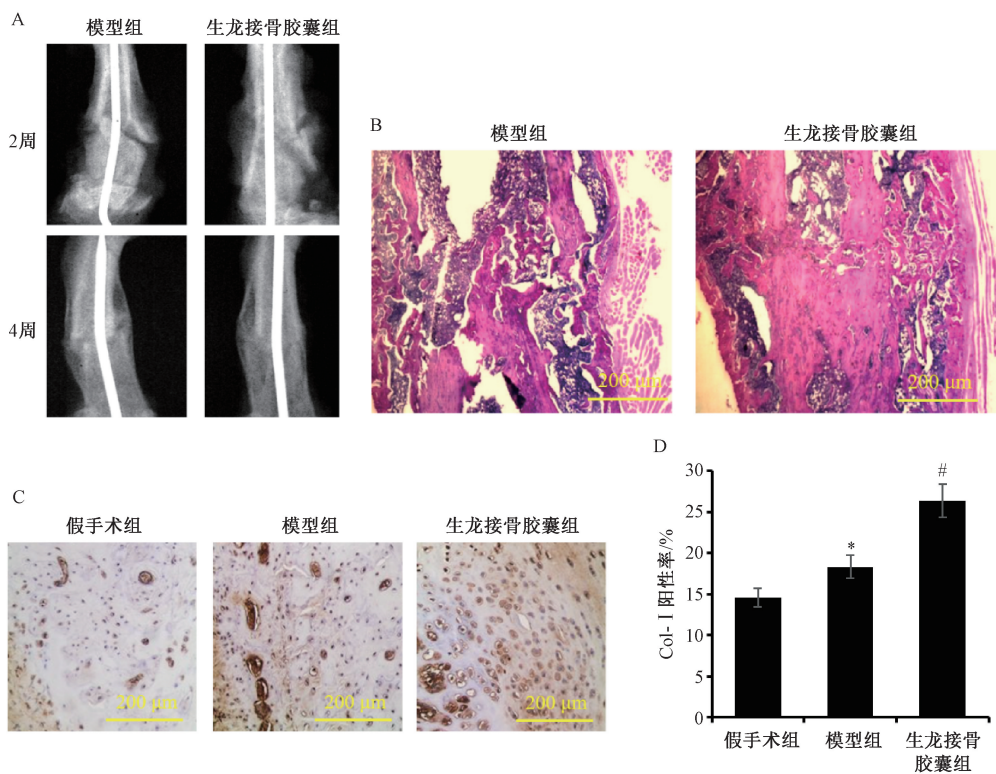
表 1 引物序列

基因	序列(5'→3')
BMP-2	正向 GACAGCGTGAGTTACCTGGGT
	反向 GTACAGGTCCCATAGGAGCGAA
Smad1	正向 TCACCAATGATGACTCTAAACCA
	反向 ACCAGAGGTTAAATTTTAA
Smad4	正向 CGAGTGATCCTACTCTGGGTGCA
	反向 TTGCGCAGCGTGGTATTTCT
RUNX-2	正向 TCAGCTAGCCACACTACCTCA
	反向 TTGGTGTTAAGGCCTCCTATGT
OSX	正向 CACCCTCTGTCTCCCTCAGTCA
	反向 TTTACCTGTGCGCTTCAGGTCATCT
VEGF	正向 CCTGTCTCTCCTCTCGCACCAA
	反向 TTGGTTGTCTAACTGCCGCTTTTCT
GAPDH	正向 GGAATGAGGGATTGGGCAGTGT
	反向 TCCAGAGATTATGGACGTATCATGC

2.10 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，均符合正态分布，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析及 LSD 和 Dunnett's T3 事后检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 生龙接骨胶囊对胫骨骨折愈合的影响 X 线片显示（图 1A），模型组大鼠在给药 2 周和 4 周后均可见骨折间隙；生龙接骨胶囊组在给药 2 周后可见矿化骨痂，骨折间隙模糊，4 周时骨折间隙消失，骨痂形态改善。HE 染色显示（图 1B），4 周后，模型组胫骨组织形成松散的编织骨；生龙接骨胶囊组新生骨部分从编织骨过渡到板层骨。免疫组化染色显示（图 1C~1D），与假手术组比较，模型组大鼠骨折区域中 Col- I 阳性率升高（*P*<0.05）；与模型组比较，生龙接骨胶囊组大鼠骨折区域中 Col- I 阳性率升高（*P*<0.05）。



注：A 为大鼠给药 2 周和 4 周后的 X 光检查，B 为给药 4 周后骨折区域 HE 染色（×40），C 为给药 4 周后骨折区域 Col-I 表达（×40），D 为各组 Col-I 阳性率比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=12$ ）。与假手术组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

图 1 生龙接骨胶囊对胫骨骨折愈合的影响

3.2 生龙接骨胶囊对骨折大鼠骨折区域 BMP-Smad 信号通路相关蛋白表达的影响 图 2 显示，与假手术组比较，模型组大鼠骨折区域 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF 蛋白表达均升高（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，生龙接骨胶囊组大鼠骨折区域 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF 蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）。

3.3 生龙接骨胶囊含药血清对成骨细胞活力和 ALP 活性的影响 表 2 显示，与对照组比较，生龙接骨胶囊含药血清组成骨细胞活力、ALP 活性均升高（ $P<0.05$ ）。

表 2 各组成骨细胞活力和 ALP 活性比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	OD ₄₅₀	ALP/（U·g prot ⁻¹ ）
对照组	0.68±0.05	11.12±0.85
生龙接骨胶囊组	0.96±0.07	19.44±1.49*

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

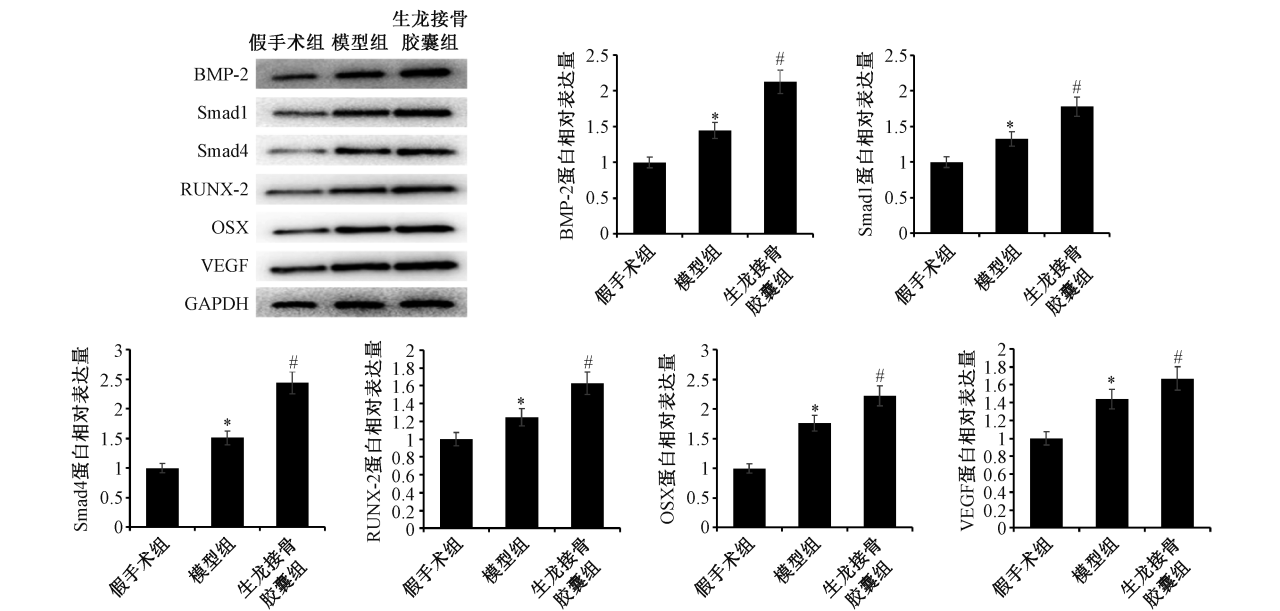
3.4 生龙接骨胶囊含药血清对成骨细胞 BMP-Smad 信号通路相关基因表达的影响 表 3 显示，与对照组比较，生龙接骨胶囊含药血清组成骨细胞 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF mRNA 表达均升高（ $P<0.05$ ）。

4 讨论

中医药在治疗骨折和促进骨折愈合方面已有数千年的历史。生龙接骨胶囊是南昌市洪都中医医院的院内制剂，目前已经在多种骨折的临床治疗中进行应用。本研究 X 线片和 HE 染色结果均显示，生龙接骨胶囊明显促进了胫骨骨

折大鼠的骨愈合。Col-I 是骨组织中最重要纤维胶原蛋白成分，主要由成骨细胞分泌，是成骨的重要指标^[7]。本研究显示，生龙接骨胶囊上调了骨折区域中 Col-I 表达，从而促进了成骨。

BMP-Smad 信号通路是骨折愈合过程中最重要的细胞信号通路之一^[8]。在骨折愈合过程中，BMP-Smad 信号通路和其他与成骨相关的细胞通路共同调节细胞成骨过程^[9]。BMP-2 作为 BMPs 家族的重要成员，具有很强的成骨诱导活性，除了能诱导成骨细胞分化外，还能直接促进细胞钙化，诱导新骨形成^[10]。BMP-2 通过自分泌或旁分泌刺激间充质干细胞向成骨细胞分化^[11]。Smad 是细胞内重要的信号转导蛋白。Smad 蛋白与 BMP-2 受体结合后可被激活，将信号从胞浆传递到细胞核，并调控下游靶基因 RUNX-2 表达。Smad4 可增加骨密度、骨体积和成骨细胞数量，促进成骨细胞增殖和分化^[12]。RUNX-2 是间充质干细胞成骨分化和骨发育所必需的关键因子，也是成骨细胞分化的标志，RUNX-2 表达升高可以促进成骨细胞分化^[13]。OSX 是 RUNX-2 的下游分子，可能触发骨形成并参与矿化^[14]。另外，VEGF 也是 BMP-2 通路下游的成员。据报道，中草药通过促进 VEGF 表达，促进血管再生和重建，从而促进骨折愈合^[15]。在成骨细胞中，BMP-2 调节这些转录因子，从而调节下游功能蛋白，促进骨形成^[16-17]。本研究发现，生龙接骨胶囊上调了大鼠骨折区域 BMP-2、Smad1、Smad4、



注：与假手术组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

图 2 生龙接骨胶囊对骨折大鼠骨折区域 BMP-Smad 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

表 3 各组成骨细胞 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX、VEGF mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	BMP-2	Smad1	Smad4	RUNX-2	OSX	VEGF
对照组	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.08
生龙接骨胶囊组	1.88±0.14 *	2.15±0.17 *	3.11±0.24 *	2.09±0.16 *	1.74±0.13 *	1.88±0.14 *

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

RUNX-2、OSX 和 VEGF 蛋白表达，提示生龙接骨胶囊对骨折愈合的促进作用与激活 BMP-Smad 信号通路有关。

成骨细胞是形成骨骼的功能性细胞，负责合成和分泌各种骨形成相关的胶原蛋白和糖蛋白，在骨骼吸收时形成未矿化的骨骼基质，最后形成骨骼组织^[18-19]。为了进一步验证生龙接骨胶囊促进骨折愈合的机制，本研究使用生龙接骨胶囊含药血清处理成骨细胞，CCK-8 检测显示生龙接骨胶囊含药血清处理的成骨细胞活力升高，ALP 活性也升高。ALP 是一种主要分布在细胞膜上的钙结合转运蛋白，在骨髓间充质干细胞成骨诱导过程中最早表达，是成骨细胞形成的重要标志^[20]。这些结果证实生龙接骨胶囊可促进成骨细胞形成。此外，本研究还发现，生龙接骨胶囊含药血清处理的成骨细胞中 BMP-2、Smad1、Smad4、RUNX-2、OSX 和 VEGF mRNA 表达均升高，证实了生龙接骨胶囊对骨折愈合的促进作用部分是通过 BMP-Smad 信号通路介导的。

综上所述，本研究在体内和体外证实生龙接骨胶囊可促进骨折愈合和成骨细胞形成，其机制可能与 BMP-Smad 信号通路的激活有关。

参考文献：

[1] 郭征兵, 徐 倩. 高效液相色谱法测定生龙接骨胶囊中人参皂苷 Rg1 的含量测定 [J]. 江西医药, 2009, 44 (10): 1009-1010.

[2] 周 雄. 生龙接骨胶囊联合截骨延长术治疗胫骨骨缺损的临床研究 [J]. 当代医学, 2020, 26 (31): 157-158.

[3] 邓雄伟, 胡和军, 魏星星, 等. 生龙接骨胶囊治疗下肢长骨干术后骨不连疗效 [J]. 光明中医, 2018, 33 (17): 2508-2511.

[4] Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20 (5-6): 475-480.

[5] Wu M, Chen G, Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease [J]. Bone Res, 2016, 4: 16009.

[6] Hiltunen A, Vuorio E, Aro H T. A standardized experimental fracture in the mouse tibia [J]. J Orthop Res, 1993, 11 (2): 305-312.

[7] Ben Shoham A, Rot C, Stern T, et al. Deposition of Collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology [J]. Development, 2016, 143 (21): 3933-3943.

[8] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, et al. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (43): 29119-29125.

[9] Ashman O, Phillips A M. Treatment of non-unions with bone defects: which option and why? [J]. Injury, 2013, 44 (Suppl 1): S43-S45.

[10] Zhang G, Liu W, Wang R, et al. The role of tantalum nanoparticles in bone regeneration involves the bmp2/sm4/runx2 signaling pathway [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 2419-2435.

[11] Wang W L, Sheu S Y, Chen Y S, *et al.* Evaluating the bone tissue regeneration capability of the Chinese herbal decoction Danggui Buxue Tang from a molecular biology perspective[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 853234.

[12] Moon Y J, Yun C Y, Choi H, *et al.* Smad4 controls bone homeostasis through regulation of osteoblast/osteocyte viability [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48(9): e256.

[13] Aboushady I M, Salem Z A, Sabry D, *et al.* Comparative study of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells derived from different sources [J]. *J Clin Exp Dent*, 2018, 10 (1): e7-e13.

[14] Kim D, Ko Y, Park M, *et al.* Regulation of osteosclerosis by inoculated Cd133⁺ PC3 cells in bone-marrow microenvironmental niches[J]. *JBMR Plus*, 2019, 3(7): e10189.

[15] Lee S S, Sharma A R, Choi B S, *et al.* The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (17): 4251-4263.

[16] Liu K, Meng C X, Lv Z Y, *et al.* Enhancement of BMP-2 and VEGF carried by mineralized collagen for mandibular bone regeneration[J]. *Regen Biomater*, 2020, 7(4): 435-440.

[17] Pulkkinen H H, Kiema M, Lappalainen J P, *et al.* BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF[J]. *Angiogenesis*, 2021, 24(1): 129-144.

[18] Park H, No A L, Lee J M, *et al.* PDE4 inhibitor upregulates PTH-induced osteoclast formation *via* CRE-mediated COX-2 expression in osteoblasts [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584 (1): 173-180.

[19] Chen G, Deng C, Li Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(2): 272-288.

[20] Zhang Y, Sun Y, Liu J, *et al.* MicroRNA-346-5p regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inhibiting transmembrane protein 9 [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 8822232.

藤黄酸对肾透明细胞癌凋亡及铁死亡的影响

谢若鑫， 邱剑光*， 王德娟， 袁 昊
(中山大学附属第六医院，广东 广州 510655)

摘要：**目的** 探讨藤黄酸对肾透明细胞癌凋亡及铁死亡的影响。**方法** 使用不同浓度藤黄酸干预 786-O 及 ACHN 细胞 24 h，CCK-8 法检测细胞活力以筛选合适的作用浓度。流式细胞术检测细胞活性氧（ROS）和线粒体活性氧（mitoROS）水平，铁离子比色法检测试剂盒检测游离铁水平变化，Western blot 法检测凋亡蛋白（Bcl-2、Bax）和铁死亡蛋白（FTH1、GPX4）表达。**结果** 藤黄酸能够抑制 786-O、ACHN 细胞活力，并浓度依赖性地升高细胞凋亡率和 ROS、mitoROS、游离铁水平（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。添加铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1（Fer-I）后可在一定程度上恢复藤黄酸诱导的 ROS、mitoROS、游离铁水平变化（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。藤黄酸干预后，786-O、ACHN 细胞的铁死亡标志蛋白 FTH1 和 GPX4 表达均降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），且 Fer-I 部分恢复了 FTH1 和 GPX4 蛋白表达（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。**结论** 藤黄酸可能通过下调 Bcl-2/Bax 比值诱导肾透明细胞癌凋亡，并通过抑制 FTH1 和 GPX4 蛋白表达诱导铁死亡。

关键词：藤黄酸；肾透明细胞癌；凋亡；铁死亡

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2023)06-2011-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.045

在全球范围内，肾细胞癌（renal cell carcinoma，RCC）是第九大最常见的癌症，其中肾透明细胞癌，即透明细胞肾细胞癌（clear cell renal cell carcinoma，ccRCC）是肾细胞癌最常见的病理亚型，占有肾细胞癌病例近 80%^[1-2]。ccRCC 需要借由高活性脂质和糖原合成、沉积维持其独特的透明形态^[3]，这与铁死亡（一种通过细胞内活性氧和脂

质过氧化物累积的铁依赖性细胞程序性死亡方式）存在一定联系^[4-5]。藤黄酸是一种由藤黄提取纯化，具有多种生物活性的天然成分，有抗炎、抗氧化、抗菌等作用^[6]。近年来，藤黄酸已被证实具有多种抗癌活性，如促进癌细胞凋亡、自噬，抑制增殖、转移和血管活性^[7-8]。目前关于藤黄酸的Ⅱb 期临床试验正在进行，其中就包括肾癌^[9]。在癌

收稿日期：2022-12-19
基金项目：广东省自然科学基金项目（Z20190107202209744）
作者简介：谢若鑫（1996—），男，硕士生，研究方向为泌尿系统肿瘤及中药药理。E-mail: xieruoxinceo@163.com
* 通信作者：邱剑光（1972—），男，主任医师，研究方向为泌尿系统肿瘤。E-mail: qiujiu@mail.sysu.edu.cn