

基于 Nrf2-HO-1/GPX4 信号轴探讨中药靛玉红衍生物 E804 抑制肺癌 A549 细胞增殖和迁移的作用机制

袁育珺¹, 曹华华², 赵敏³, 罗宇慧¹, 张素梅⁴

摘要 目的 探讨中药靛玉红衍生物 E804 对非小细胞肺癌(NSCLC)系 A549 细胞增殖和迁移的影响,并阐明 Nrf2-HO-1/GPX4 信号轴可能的作用机制。方法 以肺癌 A549 细胞为细胞模型。采用 MTT 和细胞划痕实验观察 0、10 $\mu\text{mol/L}$ E804 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 不同特异性抑制剂(Nec-1、CQ、Z-VAD、DFO、Fer-1 和 Lip-1)组细胞的增殖和迁移能力;采用 DCFH-DA 荧光探针法检测 0、2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组细胞内活性氧(ROS)含量,比色法检测二价铁离子(Fe^{2+})含量,分光光度法检测还原型谷胱甘肽(GSH)含量,微量法检测丙二醛(MDA)含量;Western blot 法检测 0、2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组细胞 SLC7A11、Transferrin、GPX4、SLC40A1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平。**结果** 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ E804)比较,2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 升高细胞内 ROS、 Fe^{2+} 和 MDA 水平,降低细胞内 GSH 含量($P < 0.01$),同时降低 SLC7A11、GPX4、SLC40A1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平($P < 0.01$),升高 Transferrin 表达水平($P < 0.05$)。与单独使用 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组比较,细胞凋亡抑制剂(Z-VAD)组和细胞铁死亡抑制剂(DFO、Fer-1 和 Lip-1)组能够部分逆转 E804 对 A549 细胞的增殖和迁移抑制($P < 0.01$)。**结论** E804 可抑制 A549 细胞增殖和迁移,并诱发铁死亡,其机制可能与抑制 Nrf2-HO-1/GPX4 信号轴有关。

关键词 非小细胞肺癌;中药靛玉红衍生物;铁死亡;Nrf2-HO-1/GPX4 信号轴

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0331-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.024

肺癌主要有两种类型:非小细胞肺癌(non-

smallcell lung cancer, NSCLC)和小细胞肺癌,其中 NSCLC 约占所有新诊断肺癌的 85%^[1],是肺癌主要的病理类型。越来越多的临床研究^[2]证实,铁死亡在 NSCLC 中发挥着重要的调控作用,甚至在一线抗癌药物中能够作为一种“催化剂”增强 NSCLC 的治疗疗效。铁死亡是一种新型的非凋亡细胞死亡模式,其特征是铁依赖性的脂质过氧化和活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积^[3]。研究^[4-5]表明核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf2) - 血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)/谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase 4, GPX4)轴参与铁死亡调控,与临床上多种疾病的发生和发展有关,如肿瘤、类风湿性关节炎、神经退行性疾病、缺血再灌注和心脏相关疾病等。课题组前期研究显示,中药靛玉红衍生物 E804 可通过抑制细胞的增殖、迁移和分化等多种机制发挥抗 NSCLC 系 A549 细胞作用,但其抑制肺癌细胞增殖和迁移是否与细胞铁死亡有关尚不清楚。所以,该研究探讨 E804 抑制 A549 细胞增殖和迁移与细胞铁死亡的关系,并从 Nrf2-HO-1/GPX4 信号轴探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 SW-CJ-1F 标准型净化工作台购自苏州安泰公司;NBS 150 型 CO_2 培养箱购自美国 BioTek 公司;自动化酶标仪、蛋白提取仪、垂直和水平电泳槽、电泳仪、蛋白凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司;DMI3000B 倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 试剂 E804 购自武汉远成生物科技有限公司;肺癌 A549 细胞由实验室内部提供,其基础营养液(如 DMEM 和小牛血清)均购自北京索莱宝科技有限公司;细胞坏死抑制剂(necrostatin-1, Nec-1)、细胞自噬抑制剂(chloroquine, CQ)、细胞凋亡抑制剂[Z-Val-Ala-Asp(OMe), Z-VAD]、细胞铁死亡抑制剂(deferoxamine, DFO)、细胞铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1)和细胞铁死亡抑制剂(Liproxstatin-1, Lip-1)均购自美国 TargetMol 公司;DCFH-DA 试

2024-01-02 接收

基金项目:江西省中医药管理局科技计划项目(编号:2023B1322);
江西省卫生健康委科技计划项目(编号:202410703)

作者单位:¹ 江西省九江学院附属医院检验科,九江 332000

² 九江市中医院检验科,九江 332000

³ 南昌市人民医院病理科,南昌 330000

⁴ 安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:袁育珺,男,硕士研究生;

张素梅,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:
379236778@qq.com

剂盒购自美国 Sigma 公司;二价铁离子(Fe^{2+})检测试剂盒、谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒均购自合肥碧云天生物试剂公司;铁死亡相关一抗(SLC7A11、GPX4、SLC40A1、Transferrin、Nrf2、HO-1和 β -actin)购自美国 Santa Cruz 公司,分装后于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存;Western blot 相应二抗(如:山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG)均购自美国 Pierce 公司。

1.3 方法

1.3.1 MTT 法检测各组细胞增殖率 A549 细胞株接种于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。取对数期生长的 A549 细胞进行下列实验。细胞随机分为对照组($0\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804)、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 组和不同抑制剂组($10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 分别加 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Nec-1、 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ CQ、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Z-VAD、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DFO、 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Fer-1 和 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ Lip-1)。处理 72 h。MTT 实验严格参考文献操作,按如下公式计算细胞增殖率:增殖率% = [对照孔(optical density, OD)₅₇₀ - 试验孔 OD₅₇₀]/对照孔 OD₅₇₀ × 100%^[6],实验重复 3 次。

1.3.2 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力 取对数期生长的 A549 细胞,按照“1.3.1”进行分组,具体方法严格按照参考文献^[6]。各组细胞于 0 h 做好标记并拍照,处理 72 h 后拍照。实验重复 3 次。

1.3.3 DCFH-DA 检测各组细胞活性氧 ROS 水平 取对数期生长的 A549 细胞,随机分为对照组($0\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804)、 2.5 、 5 和 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 组。处理 72 h,室温下各组加 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 处理 10 min, PBS 洗涤 3 次,荧光显微镜下观察并拍照,各组荧光含量用荧光酶标仪进行定量。实验重复 3 次。

1.3.4 试剂盒检测各组细胞中 Fe^{2+} 、MDA 和 GSH 水平 取对数期生长的 A549 细胞,按照“1.3.3”进行分组。用 Fe^{2+} 检测试剂盒(比色法)、MDA 检测试剂盒(分光光度法)和 GSH 检测试剂盒(微量法)分别检测各组细胞中的 Fe^{2+} 、MDA 和 GSH 含量,严格按照相应说明书操作。

1.3.5 Western blot 检测各组细胞中蛋白表达水平 取对数生长的 A549 细胞,按照“1.3.3”进行批量分组。按参考文献^[6]方法:提取细胞总蛋白、蛋白浓度定量和蛋白加热变性。每孔上样 $30\text{ }\mu\text{g}$ 相应蛋白样品,采用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行电泳,将相应蛋白转移置 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温下结合 2 h, PBS 洗膜 3 次,分别加入目标蛋白浓

度 SLC7A11 ($1:800$)、GPX4 ($1:100$)、SLC40A1 ($1:500$)、Transferrin ($1:800$)、 β -actin ($1:2000$)、Nrf2 ($1:1000$) 和 HO-1 ($1:1500$),置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜;次日 PBS 洗膜 3 次,加入相应目标蛋白二抗 SLC7A11 ($1:1000$)、GPX4 ($1:800$)、SLC40A1 ($1:1500$)、Transferrin ($1:1000$)、 β -actin ($1:2000$)、Nrf2 ($1:1500$) 和 HO-1 ($1:1000$) 室温下孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次,暗室内 ECL 显影并拍照,实验重复 3 次。本次实验采用 β -actin 作为参照,运用 Image Pro 4.5 软件扫描目标条带灰度值,根据灰度值计算目标蛋白表达水平,目标蛋白表达水平 = 目标蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值。

1.4 统计学处理 本次实验数据采用 SPSS 19.0 和 Image Pro 4.5 软件进行数据处理,并用 Adobe photoshop 10 和 GraphPad Prism 8 软件进行作图。各组细胞增殖百分率、铁死亡相关蛋白和 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达水平符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;本实验采用单因素方差分析和 t 检验进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性抑制剂对各组细胞增殖影响 本实验使用特异性抑制剂处理 72 h, MTT 检测结果显示:与 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 组比较,细胞坏死抑制剂(Nec-1)组和细胞自噬抑制剂(CQ)组对 A549 细胞的增殖影响较小($P > 0.05$);而细胞凋亡抑制剂(Z-VAD)组和细胞铁死亡抑制剂(DFO、Fer-1 和 Lip-1)组 A549 细胞的增殖有提升($P < 0.01$)。见图 1。

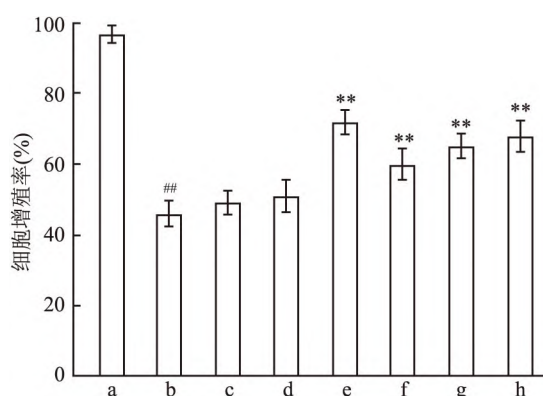
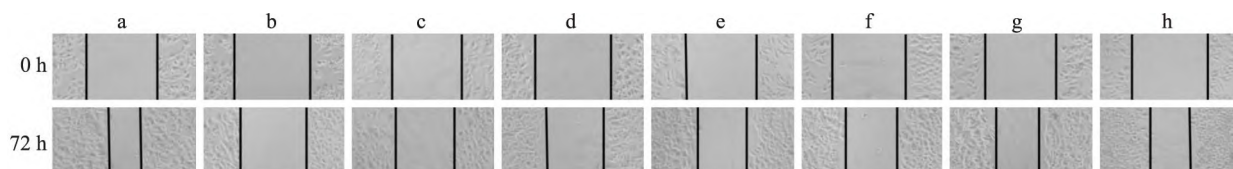


图 1 MTT 法检测各组细胞增殖率

a: 对照组; b: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 组; c: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 + $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Nec-1 组; d: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 + $15\text{ }\mu\text{mol/L}$ CQ 组; e: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 + $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Z-VAD 组; f: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 + $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DFO 组; g: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 + $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Fer-1 组; h: $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 + $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ Lip-1 组; 与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ E804 组比较: ** $P < 0.01$

图2 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力($\times 100$)

a: 对照组; b: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组; c: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 组; d: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 15 $\mu\text{mol/L}$ CQ 组; e: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ Z-VAD 组; f: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ DFO 组; g: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 组; h: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 1 $\mu\text{mol/L}$ Lip-1 组

2.2 各组细胞迁移情况 本实验使用特异性抑制剂处理 72 h, 细胞划痕结果显示, 与 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组比较, 细胞坏死抑制剂 (Nec-1) 组和细胞自噬抑制剂 (CQ) 组对 A549 细胞的迁移影响较小 ($P > 0.05$); 而细胞凋亡抑制剂 (Z-VAD) 组和细胞铁死亡抑制剂 (DFO、Fer-1 和 Lip-1) 组 A549 细胞的迁移距离有提升 ($P < 0.01$)。见图 2、3。

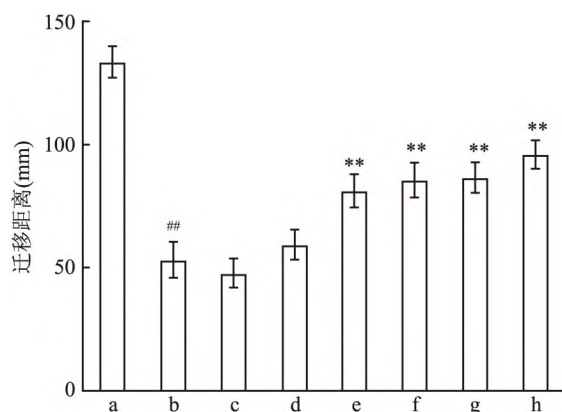
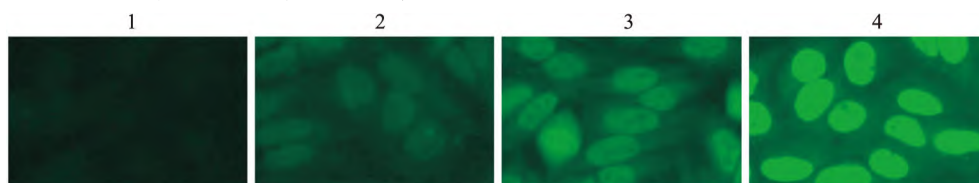


图3 各组细胞迁移距离

a: 对照组; b: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组; c: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ Nec-1 组; d: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 15 $\mu\text{mol/L}$ CQ 组; e: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ Z-VAD 组; f: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ DFO 组; g: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 10 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 组; h: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + 1 $\mu\text{mol/L}$ Lip-1 组; 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.3 各组细胞中 ROS 水平 不同浓度 E804 处理 A549 细胞 72 h, 荧光染色结果显示: 与对照组比较, 2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组荧光强度逐渐增强, 即各组 ROS 水平逐渐增强 ($F = 102.3, P < 0.01$)。见

图4 E804 对 A549 细胞内 ROS 的影响 $\times 400$

1: 对照组; 2: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ E804 组; 3: 5 $\mu\text{mol/L}$ E804 组; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组

图 4、5。

2.4 各组细胞中 Fe^{2+} 、MDA 和 GSH 水平 不同浓度 E804 处理 A549 细胞 72 h, 试剂盒检测结果显示, 与对照组比较, 2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组 Fe^{2+} 和 MDA 水平逐渐增强 ($F = 71.21, 65.02, P < 0.01$), 而 GSH 水平逐渐减弱 ($F = 76.54, P < 0.01$)。见图 6。

2.5 各组细胞铁死亡相关蛋白表达水平 不同浓度 E804 处理 A549 细胞 72 h, Western blot 检测结果显示: 与对照组比较, 2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组 SLC7A11、GPX4 和 SLC40A1 表达水平逐渐降低 ($F = 25.21, 45.13, 29.33, P < 0.01$); 而 Transferrin 表达水平均逐渐升高 ($F = 51.24, P < 0.05$)。见图 7。

2.6 各组细胞 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达水平 不同浓度 E804 处理 A549 细胞 72 h, Western blot 检测结果显示: 与对照组比较, 2.5、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平逐渐降低 ($F = 34.58, 44.71, P < 0.01$)。见图 8。

3 讨论

肿瘤细胞群体是一个高度异质性的群体, 尽管医学在肿瘤治疗领域取得了突破性进展, 但肿瘤依然是全球第二大致死因素^[7]。对于 NSCLC, 尽管传统药物治疗、抗血管生成治疗、免疫治疗和靶向治疗等新兴疗法都取得了重大突破, 但治疗仍然存在难点。因此, 迫切需要开发用于肺癌患者的新型药物。天然产物是药用化合物的宝库, 也是新型抗肿瘤活性成分的重要资源^[8]。本课题组前期研究显示从传统中药璇玉红中分离的有效成分 E804 能有效抑

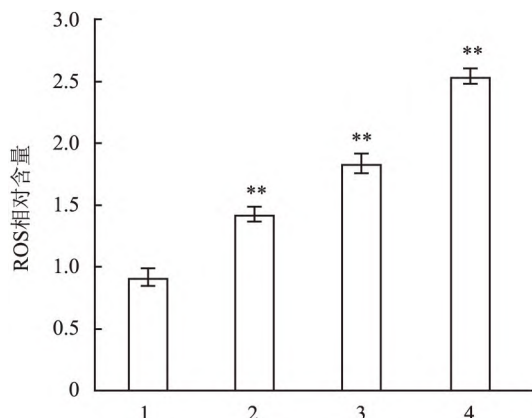


图5 各组细胞荧光相对含量

1: 对照组; 2: 2.5 μmol/L E804 组; 3: 5 μmol/L E804 组; 4: 10 μmol/L E804 组; 与对照组比较: ** P < 0.01

制 A549 细胞的增殖和迁移,是具有开发前景的天然抗肿瘤药物。

耐药性仍旧是肿瘤患者治愈的主要限制因素,目前多数抗癌药物主要通过触发肿瘤细胞凋亡发挥作用,然而,肿瘤细胞对凋亡的内在性、获得性抵抗,使治疗效果受限^[9]。因此,利用其他形式的非凋亡性细胞死亡为肿瘤清除提供新的治疗策略,如铁死亡。铁死亡是近年来发现的一种与凋亡和坏死及自噬不同的程序性细胞死亡方式,特点是细胞内脂质活性氧的增加速度超过细胞自身抗氧化系统的代偿,继而诱导细胞发生死亡^[3]。铁死亡发生时,分子层面主要表现为:细胞内铁超载、ROS 的水平增加、GSH 的水平降低以及线粒体发生特征性变化^[10];蛋白层面主要表现为:溶质载体家族(如 SLC7A11, SLC40A1 等)表达降低,GPX4 表达降低,Transferrin 表达升高,其中 GPX4 表达降低是铁死亡中最重要的分子事件^[11-12]。本次研究采用不同浓

度 E804 刺激 A549 细胞,结果显示细胞内铁死亡被激活,表现为 ROS、Fe²⁺ 和 MDA 水平呈上升趋势,GSH 含量呈下降趋势;同时,SLC40A1、GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达水平呈下降趋势,Transferrin 表达水平呈上升趋势。进一步的结果显示,细胞凋亡抑制剂(Z-VAD)和细胞铁死亡抑制剂(DFO、Fer-1 和 Lip-1)均能够部分逆转 E804 对细胞的增殖和迁移抑制作用。这些结果提示,E804 诱导 A549 细胞出现氧化损伤,推测 E804 对 A549 细胞的增殖和迁移抑制作用可能与铁死亡有关。

铁死亡是一个严谨并且复杂的过程,受多种转录因子和通路调控。Nrf2 是一种重要的转录因子,通过上调 SLC7A11 和 GPX4 抑制细胞铁死亡,也参与调节细胞的 GSH 合成、铁代谢和中间代谢物,被认为是铁死亡的重要调节因子^[13]。HO-1 是最典型的诱导型酶,受 Nrf2 基因调控。氧化应激条件下,转录因子 Nrf2 启动内源性抗氧化反应元件,并激活若干下游抗氧化酶的转录,如 HO-1^[14]。最近研究^[15]表明,在癌旁组织和肿瘤组织中 Nrf2-HO-1/GPX4 轴异常激活,高表达于不同类型的人类恶性肿瘤中。Western blot 结果显示:E804 能明显降低 Nrf2、HO-1 和 GPX4 表达水平,抑制 A549 细胞内 Nrf2-HO-1/GPX4 抗氧化轴,增加脂质过氧化和 ROS 积累,进一步加重细胞铁死亡。

综上所述,E804 可能通过抑制 A549 细胞内 Nrf2-HO-1/GPX4 抗氧化轴,下调 SLC7A11、GPX4、SLC40A1、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平,上调 Transferrin 蛋白表达水平,使细胞内 ROS、脂质过氧化水平和二价铁离子浓度升高,脂质过氧化产物 MDA 积累也增多,GSH 含量降低,诱导细胞铁死亡,并且抑制 A549 细胞增殖和迁移。本研究结果显示 E804

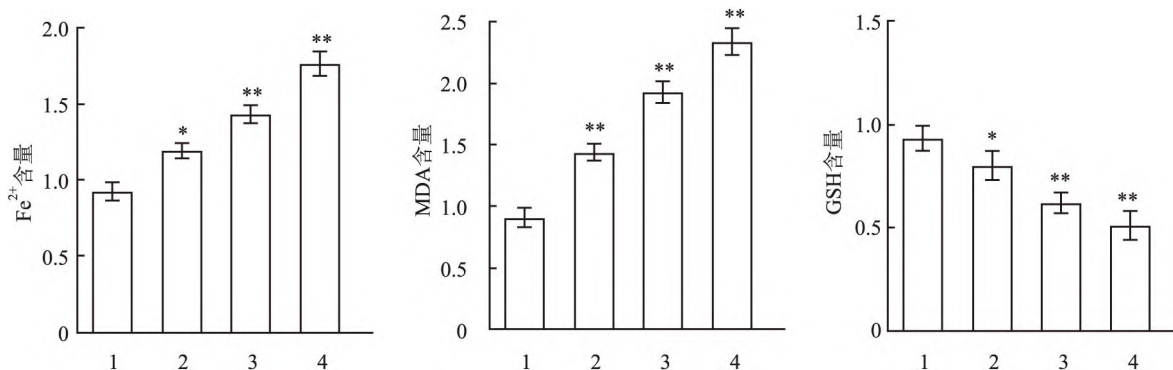


图6 E804 对 A549 细胞铁死亡的影响

1: 对照组; 2: 2.5 μmol/L E804 组; 3: 5 μmol/L E804 组; 4: 10 μmol/L E804 组; 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

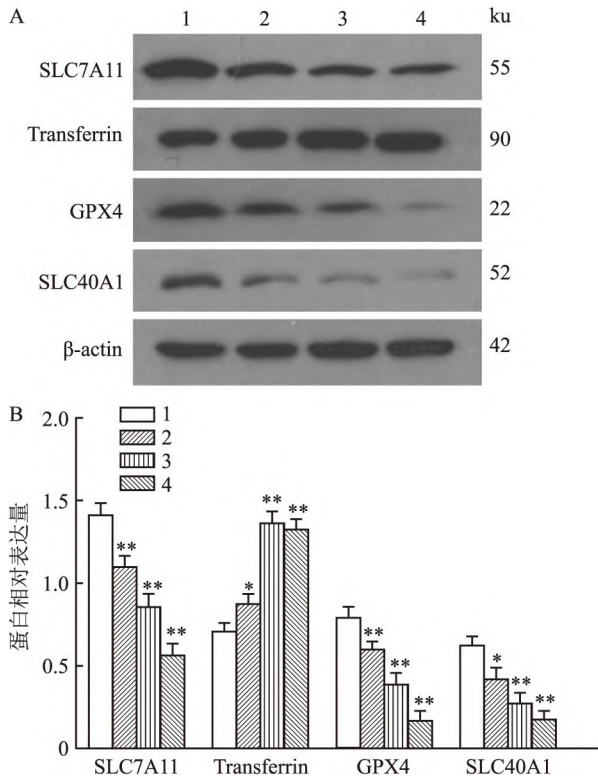


图7 Western blot 法检测各组细胞铁死亡相关蛋白电泳图(A)和直条图(B)

1:对照组;2:2.5 μmol/L E804 组;3:5 μmol/L E804 组;4:10 μmol/L E804 组;与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

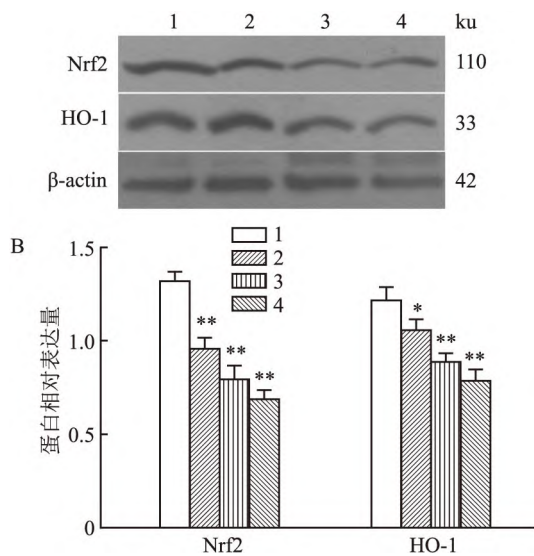


图8 Western blot 法检测各组细胞 Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

1:对照组;2:2.5 μmol/L E804 组;3:5 μmol/L E804 组;4:10 μmol/L E804 组;与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

对 A549 细胞株具有良好的抗肿瘤活性,为临床应用提供实验依据。

参考文献

[1] Oser M G, Niederst M J, Sequist L V, et al. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin[J]. Lancet Oncol, 2015, 16(4): e165-72.

[2] Liu M, Fan Y, Li D, et al. Ferroptosis inducer erastin sensitizes NSCLC cells to celastrol through activation of the ROS-mitochondrial fission-mitophagy axis[J]. Mol Oncol, 2021, 15(8): 2084-105.

[3] Stockwell B R, Friedmann A J, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. Cell, 2017, 171(2): 273-85.

[4] Yan H F, Zou T, Tuo Q Z, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 49.

[5] Mahoney-Sánchez L, Bouchaoui H, Ayton S, et al. Ferroptosis and its potential role in the pathophysiology of Parkinson's Disease[J]. Prog Neurobiol, 2021, 196:101890.

[6] 袁育珺, 朱华庆, 周青, 等. 高浓度葡萄糖诱导 HepG-2 细胞的凋亡及其调控的相关机制[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(12): 1223-6.

[7] 黄珊, 赵漫玉, 张佩景. 铁死亡调控机理及其在肿瘤治疗中的应用[J]. 科技导报, 2021, 39(7): 63-74.

[8] Wu Z, Zhong M, Liu Y, et al. Application of natural products for inducing ferroptosis in tumor cells[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2022, 69(1): 190-7.

[9] Elgendy S M, Alyamahi S K, Alhamad D W, et al. Ferroptosis: an emerging approach for targeting cancer stem cells and drug resistance[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2020, 155:103095.

[10] Li X, Zhuang X, Qiao T. Role of ferroptosis in the process of acute radiation-induced lung injury in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(2): 240-5.

[11] 余旭, 唐文静, 唐标. 铁死亡与脑卒中的神经损伤[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(7): 756-65.

[12] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620.

[13] Abdalkader M, Lampinen R, Kanninen K M, et al. Targeting Nrf2 to suppress ferroptosis and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration[J]. Front Neurosci, 2018, 12: 466.

[14] Liao Y, Jia X, Ren Y, et al. Suppressive role of microRNA-130b-3p in ferroptosis in melanoma cells correlates with DKK1 inhibition and Nrf2-HO-1 pathway activation[J]. Hum Cell, 2021, 34(5): 1532-44.

[15] Deng Y, Wu Y, Zhao P, et al. The Nrf2/HO-1 axis can be a prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 1221-30.

(下转第 343 页)

including Ding'an (5 cases), Wenchang (4 cases), Chengmai (4 cases), and Lingao (3 cases); following by western regions which included Baisha (2 cases), Ledong (2 cases), and Dongfang (3 cases). 1 case was in Wanning in the southeast. Among individuals aged 2–17, the positive proportion of *Norovirus* in males was higher than that in females. Among individuals aged over 55, the proportion of *Norovirus* positive in females was higher than that in males. The gender of positive samples among individuals aged 18–40 was related to their profession. According to RT-PCR typing and sequencing, GII group *Norovirus* were classified in 13 outbreaks. There were 4 genotypes detected. GII.2 [P16] was the main epidemic strain with 60% (9/13), and the other three genotypes were GII.4 Sydney [P31] (15.4%, 2/13) GII.4 Sydney [P16] (7.7%, 1/13) and GII.3 [P12] (7.7%, 1/13). Further genic analysis of 8 *Norovirus* strains showed that all of them were still in the same branch as the previous strain, and all exhibited a certain amount of amino acid variation. **Conclusion** *Norovirus* is the main pathogen of gastroenteritis outbreaks in Hainan province, and the main epidemic strain is GII.2 [P16]. It is necessary to continue to strengthen the monitoring that provides scientific evidence for the prevention and control of *norovirus* outbreaks in Hainan region.

Key words *Norovirus*; outbreak monitoring; genotype; genomic analysis

(上接第 335 页)

Exploring the mechanism of traditional Chinese medicine indirubin derivative E804 inhibiting the proliferation and migration of lung cancer A549 cells based on the Nrf2-HO-1/GPX4 pathway

Yuan Yujun¹, Cao Huahua², Zhao Min³, Luo Yuhui¹, Zhang Sumei⁴

¹Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang 332000; ²Clinical Laboratory, The Traditional Chinese Medicine of Jiujiang, Jiujiang 332000; ³Pathology, The People's Hospital of Nanchang, Nanchang 330000; ⁴Dept of Molecular Biology and Biochemistry, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of indirubin derivative E804 on proliferation and migration of non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 cells, and to elucidate the possible mechanism of Nrf2-HO-1/GPX4 pathway. **Methods** Lung cancer A549 cells were used as the cell model. The proliferation and migration of different specific inhibitors (Nec-1, CQ, Z-VAD, DFO, Fer-1 and Lip-1) in 0, 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 and 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 + groups were observed by MTT and cell scratch assay. The contents of reactive oxygen species (ROS) were detected by DCFH-DA fluorescence probe method, the contents of Fe^{2+} were detected by colorimetric method, the contents of reduced glutathione (GSH) were detected by spectrophotometry, and the contents of malondialdehyde (MDA) were detected by micromethod. The expression levels of SLC7A11, Transferrin, GPX4, SLC40A1, Nrf2 and HO-1 were detected by Western blot in cells of 0, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 groups. **Results** Compared with the control group (0 $\mu\text{mol/L}$ E804), 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 significantly increased intracellular ROS, Fe^{2+} and MDA levels, and decreased intracellular GSH content ($P < 0.01$). Meanwhile, the expression levels of SLC7A11, GPX4, SLC40A1, Nrf2 and HO-1 significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression level of Transferrin increased ($P < 0.05$). Compared with the 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 group alone, the apoptosis inhibitor (Z-VAD) group and the ferroptosis inhibitor (DFO, Fer-1 and Lip-1) group could significantly reverse the inhibition of proliferation and migration of A549 cells by 10 $\mu\text{mol/L}$ E804 ($P < 0.01$). **Conclusion** E804 can induce ferroptosis and inhibit the proliferation and migration of A549 cells, which may be related to the inhibition of Nrf2-HO-1/GPX4 pathway.

Key words non-small cell lung cancer; Chinese medicine indirubin derivatives; ferroptosis; Nrf2-HO-1/GPX4 pathway