

蟛蜞菊内酯对人胰腺癌 PANC-1 细胞铜死亡的诱导作用

李雨欣^{1,2}, 杨露², 李凤金², 齐玲²

(1. 大理大学基础医学院病原生物学综合实验室, 云南 大理 671000; 2. 广州医科大学附属清远医院
消化内科, 广东 清远 511500)

[摘要] **目的:** 探讨蟛蜞菊内酯 (WEL) 对人胰腺癌细胞 (PANC-1) 铜死亡的诱导作用, 并阐明其分子机制。**方法:** 不同浓度 (0~300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) WEL 分别处理 PANC-1 细胞 12、24 和 48 h 后, 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测不同浓度 WEL 作用下细胞存活率, 确定后续实验用药浓度和作用时间。人胰腺癌 PANC-1 细胞分为对照组 (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL)、8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组、17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组; 采用克隆形成实验检测各组 PANC-1 细胞克隆形成率, 5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (EdU) 染色法检测各组细胞 EdU 阳性细胞率, 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒检测各组细胞上清液中 LDH 释放量; 利用凋亡抑制剂含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 抑制剂 (Z-VAD-FMK)、铜死亡抑制剂四硫钼酸盐 (TTM)、铁死亡抑制剂铁死亡抑素 1 (Fer-1) 和坏死性凋亡抑制剂坏死抑制因子 1 (Nec-1) 与 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 作用 PANC-1 细胞 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测不同抑制剂作用下的细胞存活率, 筛选 WEL 诱导 PANC-1 细胞的死亡方式; 采用细胞铜 (Cu^{2+}) 比色法测试盒检测各组细胞内 Cu^{2+} 水平, 透射电镜观察各组 PANC-1 细胞线粒体超微结构, 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 检测各组细胞线粒体膜电位, 免疫荧光染色检测各组细胞中抗二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶 (DLAT) 表达及线粒体共定位情况, Western blotting 法检测各组细胞中铁氧还原蛋白 1 (FDX1)、硫辛酰合酶 (LIAS)、DLAT 和二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰基转移酶 (DLST) 蛋白表达水平。**结果:** CCK-8 法, 与对照组比较, 不同浓度 WEL 作用 PANC-1 细胞 12、24 和 48 h 后, 细胞存活率明显降低 ($P<0.05$), 作用 48 h 时抑制效果最显著, 因此选择 0、8.75、17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 作用 PANC-1 细胞。克隆形成实验, 与对照组比较, 8.75、17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞中克隆形成率明显降低 ($P<0.01$)。EdU 实验, 与对照组比较, 8.75、17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞中 EdU 阳性细胞率明显降低 ($P<0.01$)。LDH 实验, 与对照组比较, 8.75、17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞上清液中 LDH 释放量明显升高 ($P<0.01$)。细胞 Cu^{2+} 比色法, 与对照组比较, 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞 Cu^{2+} 水平明显升高 ($P<0.01$)。抑制剂干预实验, 与对照组比较, 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组细胞存活率明显升高 ($P<0.01$); 与 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组比较, WEL+Z-VAD-FMK 组和 WEL+TTM 组 PANC-1 细胞存活率升高 ($P<0.01$)。透射电镜, 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞线粒体膜破裂、嵴数量减少且排列稀疏。JC-1 染色, 与对照组比较, 17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞中线粒体膜电位明显降低 ($P<0.01$)。免疫荧光染色, 与对照组比较, 8.75、17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞中 DLAT 荧光强度明显增加 ($P<0.01$), 并与线粒体存在共定位。Western blotting 法, 与对照组比较, 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[收稿日期] 2025-04-15 [录用日期] 2025-05-31

[基金项目] 广东省中医药管理局科研项目 (20231412, 20251478); 广东省卫健委医学科学技术研究基金项目 (A2022163, A2024690)

[作者简介] 李雨欣 (2000—), 女, 湖南省娄底市人, 在读硕士研究生, 主要从事胰腺炎和胰腺纤维化发病机制及治疗方面的研究。

[通信作者] 李凤金, 助理研究员 (E-mail: wklifengjin@163.com);
齐玲, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: qiling1718@gzhmu.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

WEL 组 PANC-1 细胞中 FDX1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 17.50 和 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL 组 PANC-1 细胞中 DLAT、DLST 及 FDX1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 而 LIAS 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。结论: WEL 能够诱导 PANC-1 细胞发生铜死亡, 其作用机制可能与其升高 PANC-1 细胞中 Cu^{2+} 水平且上调铜死亡关键蛋白 DLAT、DLST 和 FDX1 蛋白表达水平有关。

[关键词] 螞蟥菊内酯; 胰腺肿瘤; 铜死亡; 线粒体; 二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶

[中图分类号] R735.9 [文献标志码] A

Inductive effect of wedelolactone on cuproptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells

LI Yuxin^{1,2}, YANG Lu², LI Fengjin², QI Ling²

(1. Comprehensive Pathogen Biology Laboratory, School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China; 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Qingyuan Hospital, Guangzhou Medical University, Qingyuan 511500, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the induction effect of wedelolactone (WEL) on cuproptosis in the human pancreatic cancer cells (PANC-1), and to clarify its molecular mechanism. **Methods:** The PANC-1 cells were treated with different concentrations (0–300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of WEL for 12, 24, and 48 h, respectively, cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the survival rates of the cells after treated with different concentrations of WEL to determine the drug concentration and action time for subsequent experiments. The human pancreatic cancer PANC-1 cells were divided into control group (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL), 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group, 17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group, and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group. Colony formation assay was used to detect the colony formation rates of the PANC-1 cells in various groups; 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining was used to detect the EdU positive cell rates of the cells in various groups; lactate dehydrogenase (LDH) kit was used to detect the LDH release in supernatant of the cells in various groups. After treating PANC-1 cells with caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), cuproptosis inhibitor tetrathiomolybdate (TTM), ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (Fer-1), and necroptosis inhibitor necrostatin-1 (Nec-1) combined with 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL for 48 h, CCK-8 method was used to detect the cell survival rates of the PANC-1 cells after treated with different inhibitors, and to screen the death mode induced by WEL; cell copper (Cu^{2+}) colorimetric assay kit was used to detect the intracellular Cu^{2+} levels of the cells in various groups; transmission electron microscope was used to observe the mitochondrial ultrastructure of the PANC-1 cells in various groups; mitochondrial membrane potential assay kit (JC-1) was used to detect the mitochondrial membrane potential of the cells in various groups; immunofluorescence staining was used to detect the expression and mitochondrial co-localization of dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT) in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of ferredoxin 1 (FDX1), lipoic acid synthetase (LIAS), DLAT, and dihydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST) proteins in the cells in various groups. **Results:** The CCK-8 assay results showed that compared with control group, the survival rates of the PANC-1 cells after treated with different concentrations of WEL for 12, 24, and 48 h were significantly decreased ($P < 0.05$), with the most significant inhibitory effect at 48 h; therefore, 0, 8.75, 17.50, and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL were selected to treat the PANC-1 cells. The colony formation assay results showed that compared with control group, the colony formation rates of the PANC-1 cells in 8.75, 17.50, and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups were decreased ($P < 0.01$). The EdU assay results showed that compared with control group, the EdU positive cell rates of the PANC-1 cells in 8.75, 17.50, and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups

were decreased ($P < 0.01$). The LDH assay results showed that compared with control group, the LDH release in supernatant of PANC-1 cells in 8.75, 17.50, and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups was increased ($P < 0.01$). The cell Cu^{2+} colorimetric assay kit results showed that compared with control group, the Cu^{2+} levels in the PANC-1 cells in 8.75, 17.50, and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups were increased ($P < 0.01$). The inhibitor intervention assay results showed that compared with control group, the survival rate of the PANC-1 cells in 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was decreased ($P < 0.01$); compared with 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group, the survival rates of the PANC-1 cells in WEL+Z-VAD-FMK group and WEL+TTM group were increased ($P < 0.01$). The transmission electron microscope results showed that the mitochondria in the PANC-1 cells in 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group exhibited membrane rupture, reduced number of cristae, and sparse arrangement. The JC-1 staining results showed that compared with control group, the mitochondrial membrane potential in the PANC-1 cells in 17.50 and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups was significantly decreased ($P < 0.01$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the DLAT fluorescence intensity in the PANC-1 cells in 17.50 and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups was significantly increased ($P < 0.01$) and co-localized with mitochondria. The Western blotting method results showed that compared with control group, the expression level of FDX1 protein in the PANC-1 cells in 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group was increased ($P < 0.01$), the expression levels of DLAT, DLST, and FDX1 proteins in the PANC-1 cells in 17.50 and 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL groups were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression level of LIAS protein was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** WEL can induce cuproptosis in the PANC-1 cells, and its mechanism may be related to increasing the Cu^{2+} level and up-regulating the expression levels of key cuproptosis proteins DLAT, DLST, and FDX1 in the PANC-1 cells.

KEYWORDS Wedelolactone; Pancreatic neoplasm; Cuproptosis; Mitochondria; Dihydrolipoamide S-acetyltransferase

胰腺癌是高度恶性肿瘤,严重威胁人类的生命健康。国家癌症中心的统计数据^[1]显示:2022年胰腺癌年死亡病例数/新发病人数比率高,大部分患者确诊即晚期,其5年生存率仅为8.5%,在所有癌症中处于最低。目前,胰腺癌的治疗手段有限,且化学治疗和放射治疗等辅助治疗手段效果不佳,手术切除是其唯一可能治愈的方法,但手术切除率低,且术后复发和转移的风险高^[2]。因此,开发出新的治疗方法迫在眉睫。蟛蜞菊内酯(Wedelolactone, WEL)是菊科植物墨旱莲的主要成分之一,其具有抗肿瘤、抗炎、保肝、降血糖和降脂等药理作用^[3]。研究^[4-6]表明:WEL可通过调节转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/抗DPP同源物(mothers againstdecapentaplegic homolog, Smad)信号通路抑制乳腺癌生长和转移,抑制芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)通路抑制头颈部鳞状癌细胞的增殖和迁移,促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生并诱导视网膜母细胞瘤细胞凋亡和焦亡。然而,国内外关于WEL抗

胰腺癌作用的研究尚未见相关报道。因此,本研究以人胰腺癌细胞(human pancreatic carcinoma cells, PANC-1)为研究对象,探讨WEL对PANC-1细胞增殖的抑制作用,明确其诱导细胞死亡的具体分子机制,探索胰腺癌潜在治疗新策略并改善患者预后。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人胰腺癌PANC-1细胞和人正常胰腺导管上皮(human pancreatic duct epithelial, HPDE)细胞(美国ATCC细胞库)。WEL(上海源叶生物科技有限公司),杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基和1%青-链霉素(美国Gibco公司),胎牛血清(澳大利亚ExCell Bio公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),4%~12%预制胶(南京艾思易生物科技有限公司),快速转膜液(20 \times)(广州佑佰生物制品有限公司),细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)和细胞铜(cell copper, Cu^{2+})比色法测试盒(武汉

伊莱瑞特生物科技股份有限公司), 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、凋亡抑制剂含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 抑制剂 Z-VAD-FMK、铜死亡抑制剂四硫钼酸盐 (tetrathiomolybdate, TTM)、铁死亡抑制剂铁死亡抑素 1 (ferrostatin-1, Fer-1) 和坏死性凋亡抑制剂坏死抑制因子 1 (necrostatin-1, Nec-1) (美国 MCE 公司), 线粒体膜电位检测试剂盒四甲基罗丹明乙酯 (tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE) (上海碧云天生物技术股份有限公司), 5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 法细胞增殖成像分析试剂盒 (武汉亚科因生物技术有限公司), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 抗铁氧还原蛋白 1 (ferredoxin 1, FDX1) 抗体和抗硫辛酰合酶 (lipoic acid synthetase, LIAS) 抗体 (英国 Abcam 公司), 抗二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶 (dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT) 抗体 (美国 Proteitech 公司), 抗二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶 (dihydrolipoamide S-succinyltransferase, DLST) 抗体、抗 β -actin 抗体和山羊抗兔 IgG 偶联辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 抗体 (美国 Cell Signaling 公司)。倒置荧光显微镜 (型号: LSM900, 德国 Zeiss 公司), 酶标仪 (型号: infinite 200pro, 德国 BMG 公司), 电泳系统 (型号: PowerPac HC, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 细胞培养 PANC-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。WEL 粉末溶解于二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶剂中, 初始浓度为 300 mmol·L⁻¹。

1.3 不同浓度 WEL 作用不同时间后 PANC-1 细胞存活率 取处于对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 3×10⁴ 个细胞。待细胞贴壁后, 不同浓度 (300.00、150.00、75.00、37.50、18.75、9.38、4.69、2.34、1.17 μmol·L⁻¹) 的 WEL 分别作用 12、24 和 48 h, 随后弃含药培养基, 加入 CCK-8 工作液在 37 °C 下孵育 2 h, 采用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔吸光度 (A) 值, 计算不同浓度 WEL 作用下的细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%。后续细胞实验分组为对照组

(0 μmol·L⁻¹ WEL)、8.75 μmol·L⁻¹ WEL 组、17.5 μmol·L⁻¹ WEL 组和 35.0 μmol·L⁻¹ WEL 组。

1.4 不同死亡抑制剂作用后细胞存活率 取处于对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 3×10⁴ 个细胞。待细胞贴壁后, 分别加入各抑制剂作用 2 h 后, 弃抑制剂, 再加入用培养基配置好的抑制剂和 35 μmol·L⁻¹ WEL 混合液作用 48 h, 弃含药培养基, 加入 CCK-8 工作液 37 °C 孵育 2 h, 采用酶标仪于 450 nm 波长处检测 96 孔细胞培养板中各孔 A 值, 计算不同死亡抑制剂作用后的细胞存活率。实验分组为对照组、35.0 μmol·L⁻¹ WEL 组、WEL+Z-VAD-FMK 组、WEL+TTM 组、WEL+Nec-1 组和 WEL+Fer-1 组。

1.5 克隆形成实验检测各组 PANC-1 细胞克隆形成率 各实验组取 500 个 PANC-1 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 分别加药后继续培养到 14 d 或至绝大多数单个克隆中细胞数 > 50 个即完成克隆; 采用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤 1 次, 固定 20 min, 洗涤后每孔加入结晶紫染液染色 15 min, 待水晾干后用扫描仪拍照, 计算克隆形成率。克隆形成率 = 克隆数 / 接种细胞数 × 100%。

1.6 EdU 染色检测各组 PANC-1 细胞 EdU 阳性细胞率 将处于对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 3×10⁴ 个细胞。待细胞贴壁后分别加药后再继续培养 48 h, 去除培养基, 经固定和透化后加入 EdU 反应复合物, 室温孵育 30 min, Hoechst 33342 复染细胞核。采用荧光显微镜观察 PANC-1 细胞并计数, 计算各组细胞中 EdU 阳性细胞率。EdU 阳性细胞率 = EdU 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.7 采用试剂盒检测各组 PANC-1 细胞上清液中 LDH 释放量 将处于对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 10 cm 皿中, 每孔 1.2×10⁶ 个细胞。待细胞完全贴壁后, 更换含有 WEL 的培养基继续培养 48 h。取细胞上清液, 按说明书所述顺序加入试剂后, 轻轻振荡孔板混匀, 室温放置 5 min, 采用酶标仪于 440 nm 波长处检测 A 值, 计算细胞 LDH 释放量。细胞 LDH 释放量 (U·g⁻¹) = (测定 A 值 - 对照 A 值) C_{pr} / (标准 A 值 - 空白 A 值) C_{标准}, C_{标准}: 标准品浓度, C_{pr}: 样本蛋白浓度。

1.8 采用试剂盒检测各组 PANC-1 细胞中 Cu²⁺ 水平 取处于对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 3.5 cm 培养皿中, 每皿 1×10⁵ 个细胞, 分别加药后再继续

培养48 h。加药48 h后离心并收集各组细胞,并加入裂解液冰上裂解10 min,离心后取上清液进行测定,同时取部分上清液进行BCA蛋白浓度测定。向标准孔和测定孔中分别加入显色剂工作液,盖上覆膜,37℃孵育5 min,采用酶标仪于波长580 nm处检测各孔A值,根据标准孔计算出标准品拟合曲线: $y=ax+b$,计算 Cu^{2+} 水平。 Cu^{2+} 水平($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)= $(\text{样本孔A值}-\text{空白A值}-b)\times\text{Cpr}/a$, y :标准孔A值-空白孔A值, x :标准品的浓度, a :标准曲线斜率, b :标准曲线截距,Cpr:样本蛋白浓度。

1.9 透射电镜观察各组PANC-1细胞线粒体超微结构 将处于对数生长期的PANC-1细胞接种于10 cm皿中,每孔 1.2×10^6 个细胞。待细胞完全贴壁后,更换为含有WEL的培养基继续培养48 h。弃掉含药培养基,经戊二醛固定、脱水、渗透、包埋聚合、切片和染色后,透射电镜下观察线粒体超微结构。

1.10 JC-1荧光探针法检测各组PANC-1细胞线粒体膜电位 将处于对数生长期的PANC-1细胞接种于96孔细胞培养板中,每孔 3×10^4 个细胞。待其生长至所需密度后分别加药继续培养48 h,按照试剂盒说明书操作,行JC-1染色,DAPI复染细胞核,采用荧光显微镜观察荧光强度,健康线粒体JC-1发出红色荧光,线粒体损伤时JC-1发出绿色荧光,JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变表明细胞膜电位降低。

1.11 免疫荧光法检测各组PANC-1细胞中DLAT蛋白表达和定位 将处于对数生长期的PANC-1细胞接种于96孔细胞培养板中,每孔 3×10^4 个细胞。待细胞完全贴壁后分别加药后再继续培养48 h,随后按照试剂盒说明书操作,行TMER染色,再加入抗DLAT抗体4℃孵育过夜,洗涤3次后,加入对应二抗室温孵育1 h,DAPI复染细胞核,采用荧光显微镜观察荧光强度。积分荧光信号=红色荧光强度/绿色荧光强度 $\times 100\%$ 。

1.12 Western blotting法检测各组PANC-1细胞中FDX1、LIAS、DLAT和DLST蛋白表达水平 将处于对数生长期的PANC-1细胞接种于10 cm皿中,每孔 1.2×10^6 个细胞,分别加药后再继续培养48 h。随后离心并收集各组细胞,向细胞沉淀中加入蛋白裂解液,超声裂解后,离心收集上清,采用BCA法测定各组蛋白浓度。随后进行电泳、转膜和封闭,分别加入抗 β -actin、FDX1、LIAS、

DLAT和DLST蛋白,4℃孵育过夜,洗涤后加对应二抗室温孵育1 h。化学发光显色,凝胶成像系统记录各蛋白条带。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.13 统计学分析 采用Graphpad Prism 8.0.1软件进行统计学分析。不同浓度WEL作用下PANC-1细胞存活率、LDH释放量、 Cu^{2+} 水平和荧光强度,细胞中各种蛋白表达水平均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度WEL处理不同时间后HPDE和PANC-1细胞存活率 不同浓度WEL作用PANC-1细胞不同时间后,与对照组比较,不同浓度WEL组细胞存活率降低($P<0.05$),以48 h最为明显。WEL对HPDE细胞的毒性较低,提示WEL对PANC-1细胞具有选择抑制作用。因此,选定0、8.75、17.50和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL进行后续实验,48 h为最佳作用时间。见表1。

2.2 各组PANC-1细胞克隆形成率 与对照组(78.00% \pm 12.17%)比较,8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(42.00% \pm 10.69%)、17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(11.00% \pm 8.08%)和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(1.00% \pm 1.15%) PANC-1细胞克隆形成率明显降低($P<0.01$),PANC-1细胞集落形成数量明显减少,呈剂量依赖性。见图1。

2.3 各组PANC-1细胞中EdU阳性细胞率 与对照组(42.94% \pm 0.81%)比较,8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(38.42% \pm 0.36%)、17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(30.79% \pm 0.87%)和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(26.85% \pm 0.24%) PANC-1细胞的EdU阳性细胞率明显降低($P<0.01$),呈剂量依赖性。见图2。

2.4 各组PANC-1细胞上清液中LDH释放量 与对照组(1.00 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.01 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)比较,8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(1.25 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.12 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)、17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(1.66 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.06 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(2.53 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.10 \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) PANC-1细胞上清液中LDH释放量均明显升高($P<0.01$),并呈剂量依赖性。

表1 不同浓度 WEL 处理不同时间各组 HPDE 和 PANC-1 细胞存活率

Tab. 1 Survival rates of HPDE and PANC-1 cells in various groups after treated different concentrations of WEL

 $(n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%)$

Group	Survival rate of HPDE cells			Survival rate of PANC-1 cells			
	(t/h)	12	24	48	12	24	48
WEL ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)							
0		100.00 \pm 3.98	100.00 \pm 3.72	100.00 \pm 6.89	100.00 \pm 2.00	100.00 \pm 1.82	100.00 \pm 4.93
1.17		106.49 \pm 6.83	95.92 \pm 4.14	91.10 \pm 7.25	97.40 \pm 2.28	94.73 \pm 2.07	96.99 \pm 4.71
2.34		101.66 \pm 3.97	92.88 \pm 2.32	91.70 \pm 8.50	98.41 \pm 3.97	88.89 \pm 2.22	94.76 \pm 6.21
4.69		108.32 \pm 8.81	91.18 \pm 1.09	90.04 \pm 2.57	97.95 \pm 4.91	90.36 \pm 2.68	92.37 \pm 7.09
9.38		107.93 \pm 9.70	92.68 \pm 5.46	98.81 \pm 6.78	97.17 \pm 5.33	86.64 \pm 3.62	93.54 \pm 7.82
18.75		103.42 \pm 5.87	89.35 \pm 4.51	93.12 \pm 10.43	93.02 \pm 2.86	79.55 \pm 3.11*	80.16 \pm 9.25
37.50		99.49 \pm 4.24	85.68 \pm 4.96*	93.26 \pm 10.07	84.38 \pm 2.18*	56.37 \pm 3.51**	43.21 \pm 4.34**
75.00		97.87 \pm 2.92	81.60 \pm 3.29*	77.52 \pm 7.45**	76.04 \pm 3.05**	41.05 \pm 2.63**	18.03 \pm 0.58**
150.00		103.14 \pm 3.16	78.64 \pm 5.49**	74.10 \pm 5.44**	75.01 \pm 2.60**	38.39 \pm 1.69**	17.18 \pm 0.33**
300.00		89.11 \pm 2.27	68.20 \pm 3.27**	57.72 \pm 3.01**	68.52 \pm 2.95**	36.84 \pm 0.83**	19.26 \pm 0.39**

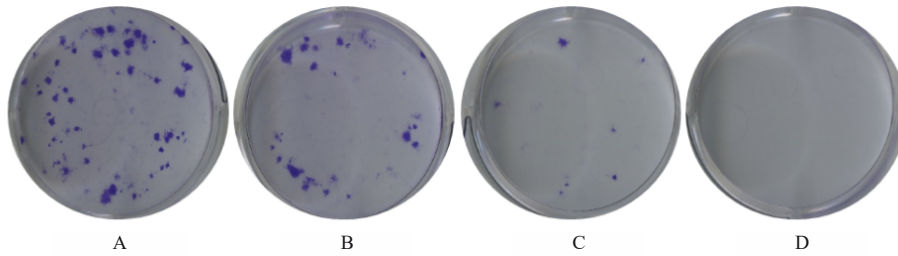
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group.A: Control group; B: 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group; C: 17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group; D: 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group.

图1 各组 PANC-1 细胞集落形成情况(结晶紫)

Fig. 1 Colone formation in PANC-1 cells in various groups(Crystal violet)

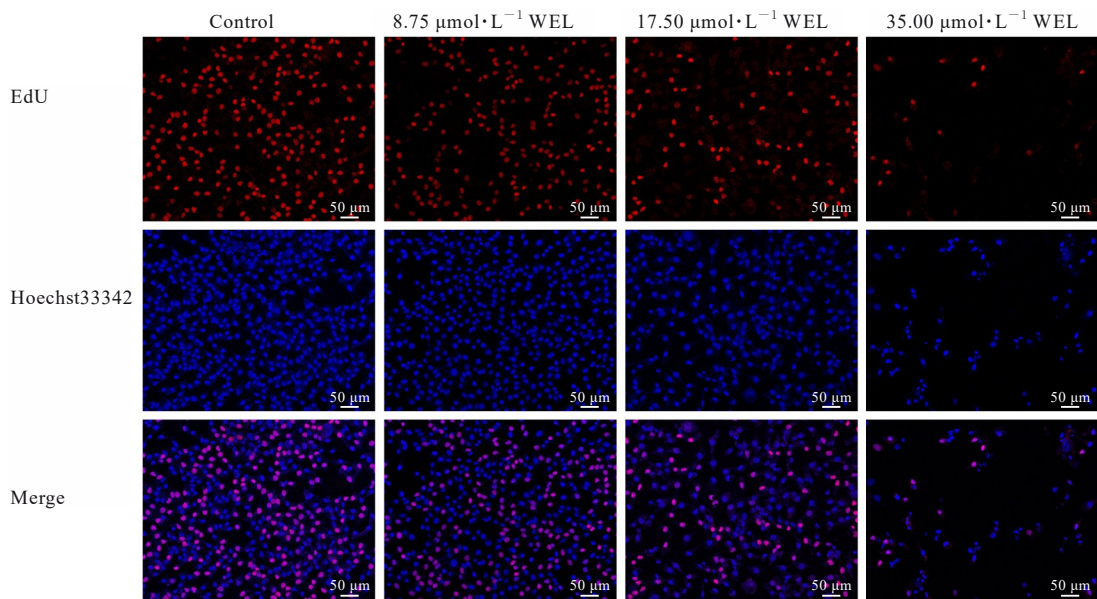


图2 EdU 染色法观察各组 PANC-1 细胞 EdU 阳性表达情况

Fig. 2 EdU positive expression in PANC-1 cells in various groups observed by EdU staining method

2.5 细胞死亡抑制剂处理后各组PANC-1细胞存活率 与对照组(100.00%±8.05%)比较, 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(49.92%±2.30%) PANC-1细胞存活率明显降低($P<0.01$); 与35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组比较, WEL+Z-VAD-FMK组(72.47%±3.76%)和WEL+TTM组(78.37%±6.38%) PANC-1细胞存活率升高($P<0.01$); 与35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组比较, WEL+Nec-1组(55.35%±4.75%)和WEL+Fer-1组(46.62%±6.17%) PANC-1细胞存活率无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 各组PANC-1细胞中 Cu^{2+} 水平 与对照组(1.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)比较, 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(4.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) PANC-1细胞中 Cu^{2+} 水平明显升高($P<0.01$), 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(0.93 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.22 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)和17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(0.93 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\pm 0.22 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) PANC-1细胞中 Cu^{2+} 水平无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.7 各组PANC-1细胞线粒体超微结构 对照组PANC-1细胞中, 线粒体呈椭圆形或杆状, 具有完整的双层膜结构, 有内膜向内折叠形成的嵴, 结构清晰, 排列紧密, 内部基质均匀。与对照组比较, 35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组PANC-1细胞中线粒体嵴的结构断裂、数量减少甚至完全消失, 线粒体外膜膨破裂、内容物渗漏, 呈现空泡样改变。见图3。

2.8 各组PANC-1细胞线粒体膜电位 与对照组(4.14%±0.95%)比较, 17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(1.74%±0.23%)和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组

(0.36%±0.02%) PANC-1细胞线粒体膜电位明显降低($P<0.01$), PANC-1细胞中红色荧光逐渐减弱, 绿色荧光逐渐增强。与对照组比较, 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(2.96%±1.05%) PANC-1细胞线粒体膜电位变化不明显, 差异无统计学意义($P>0.05$)。见图4。

2.9 各组PANC-1细胞中DLAT蛋白表达水平和定位水平 对照组PANC-1细胞中DLAT绿色荧光强度较弱。与对照组(19.45%±2.88%)比较, 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(50.15%±3.22%)、17.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(59.39%±7.33%)和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组(81.44%±6.57%) PANC-1细胞中DLAT绿色荧光强度明显增加, 即DLAT蛋白表达水平升高($P<0.01$)。见图5。同时, 能观察到DLAT与线粒体TMRE在PANC-1细胞存在显著共定位现象。

2.10 各组PANC-1细胞中FDX1、LIAS、DLAT和DLST蛋白表达水平 与对照组比较, 8.75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组PANC-1细胞中DLAT、DLST和LIAS蛋白表达水平无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$), FDX1蛋白表达水平明显升高($P<0.01$); 17.50和35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组PANC-1细胞中DLAT、DLST及FDX1蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), 而LIAS蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。见图6。

3 讨论

本研究探讨WEL对胰腺癌PANC-1细胞增殖的抑制作用, 揭示了WEL通过铜死亡通路发挥抗胰腺癌作用的分子机制。细胞克隆形成实验是测定肿瘤细胞增殖能力的常用方法之一^[7]。本研究结果显示: WEL能显著降低PANC-1细胞克隆形成率。同时, EdU实验是一种通过标记DNA合成来检测细胞增殖的常用方法, 其原理是细胞在S期合成DNA时摄入EdU^[8]。本研究结果显示: WEL能显著降低EdU阳性细胞率。LDH是一种氧化还原酶, 常以LDH的释放量评估细胞毒性, LDH释放量与死亡细胞的数量成正比^[9]。本研究LDH实验结果显示: 随WEL作用浓度升高, LDH释放量逐渐升高, 表明WEL能够诱导PANC-1细胞死亡。为了进一步探讨WEL诱导PANC-1细胞死亡的模式, 本研究利用凋亡、坏死、铁死亡和铜死亡4种细胞死亡抑制剂进行干预实验。实验结果显示: 凋亡抑制剂Z-VAD-FMK和铜死亡抑制剂TTM均能够逆

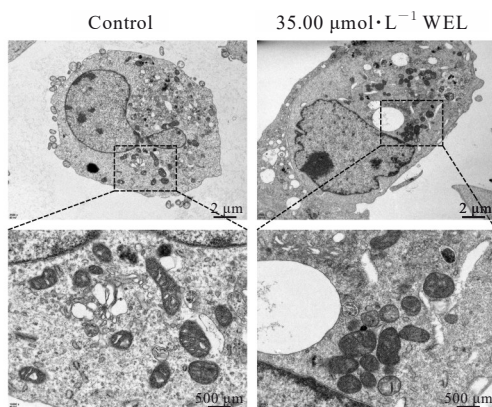


图3 透射电镜观察2组PANC-1细胞线粒体超微结构
Fig. 3 Ultrastructure of mitochondria of PANC-1 cells in two groups observed by transmission electron microscope

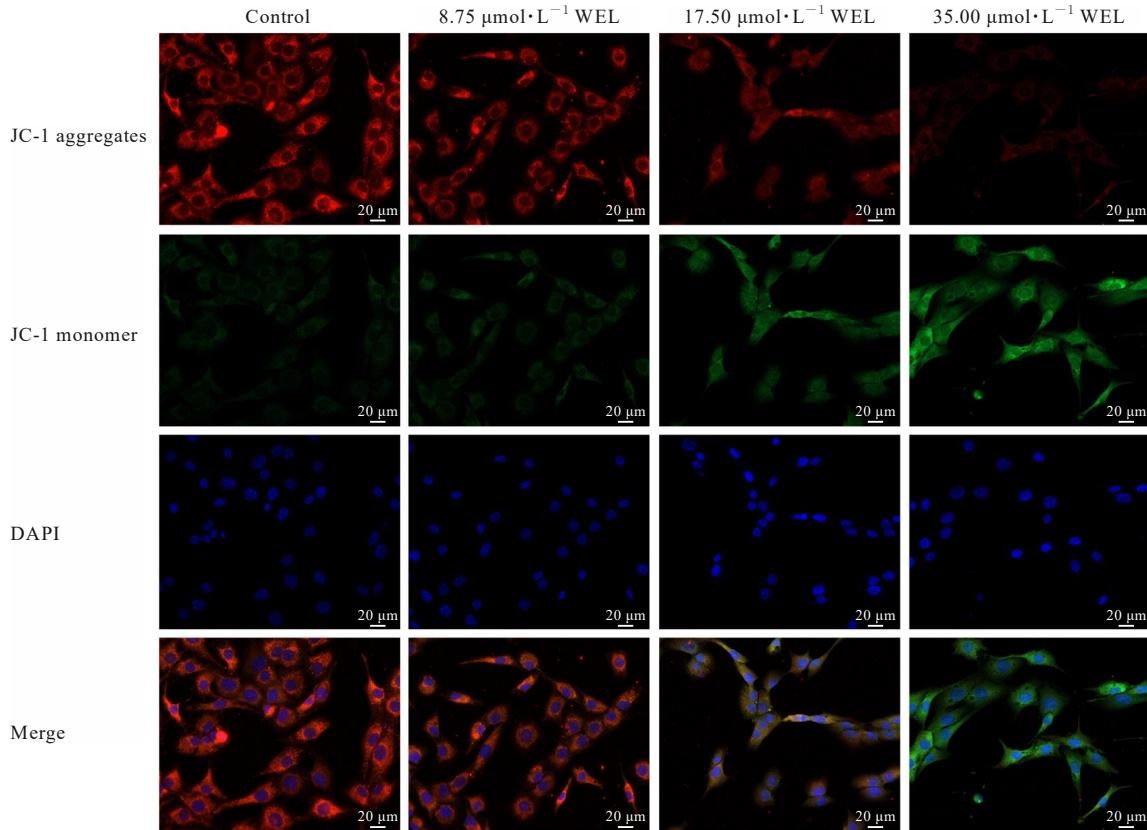


图4 JC-1法检测各组PANC-1中线粒体膜电位

Fig. 4 Membrane potential of mitochondria in PANC-1 in various groups detected by JC-1 method

转WEL对PANC-1细胞的死亡。WEL诱导细胞凋亡抑制肿瘤细胞增殖的作用已有相关文献^[10-12]报道。因此,本研究针对WEL诱导PANC-1细胞死亡与铜死亡相关性进行后续分析。

铜死亡是一种与线粒体呼吸相关的铜依赖性细胞死亡模式,与细胞凋亡、铁死亡和坏死等模式存在区别^[13]。铜死亡依赖于细胞内 Cu^{2+} 的积累,在正常情况下,细胞内的 Cu^{2+} 水平维持在极低水平^[14]。在线粒体中,当 Cu^{2+} 积累时, Cu^{2+} 会直接结合三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中的脂酰化成分,导致蛋白聚集和功能失调,阻断TCA,刺激蛋白质毒性应激,导致线粒体功能障碍和损伤,最终诱导细胞死亡^[15-16]。本研究结果显示:与对照组比较,35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组细胞内 Cu^{2+} 水平明显升高。透射电镜下可观察到35.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL组PANC-1细胞线粒体嵴结构断裂、减少或消失,失去正常折叠形态。JC-1染料以电势依赖性的方式积聚在线粒体内,用来检测线粒体膜电位水平。在正常细胞线粒体内,JC-1聚集在线粒体基质而发出强烈的红色荧光^[17]。本研究结果显示:随着WEL浓度升高,JC-1红色荧光

逐渐减弱,绿色荧光逐渐增强,提示PANC-1细胞膜电位降低。TMRE是一种可渗透细胞膜的橘红色阳离子荧光探针,可在完整的线粒体中聚集^[18]。本研究结果显示:WEL能够显著增强DLAT的荧光强度,并且DLAT与线粒体膜电位标志物TMRE存在显著共定位,提示WEL可能通过影响线粒体功能进而影响DLAT的表达。

当细胞内 Cu^{2+} 积累时,FDX1能够将 Cu^{2+} 还原为毒性更强的 Cu^+ ,并催化DLAT、DLST和LIAS发生脂酰化,随后, Cu^+ 进一步结合到线粒体DLAT的脂酰化部位,使DLAT发生寡聚化,产生铜毒性,最终导致细胞死亡^[19]。DLAT和DLST是TCA循环中重要的硫辛酰化蛋白基因^[20]。其中,DLAT是铜死亡下游的重要分子,是一种抗线粒体抗体的抗原,DLAT功能的缺失会诱导细胞代谢从TCA循环转变为有氧糖酵解,从而导致乳酸产量增加,最终促进肿瘤进展^[21]。LIAS是蛋白质脂酰化的关键调节因子,参与DLAT的蛋白质脂酰化的调节,在铜死亡发生过程中,LIAS的表达水平均显著降低^[22-23]。本研究Western blotting法检测结果显示:与对照组比较,

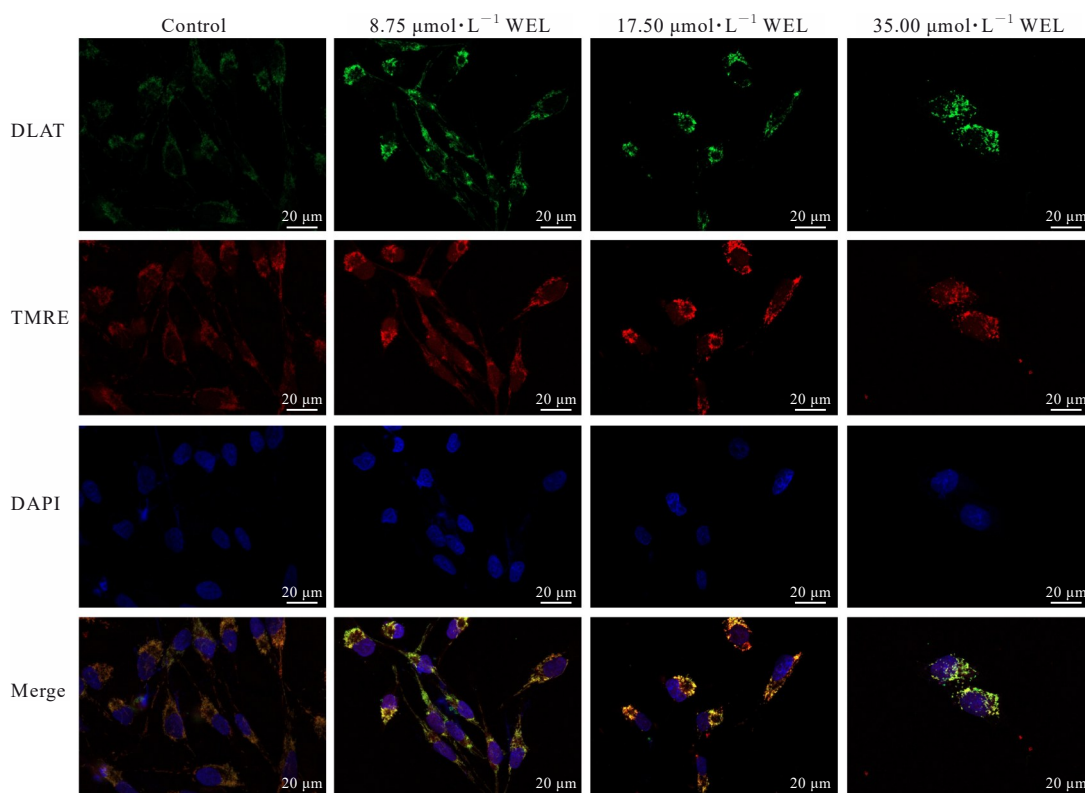
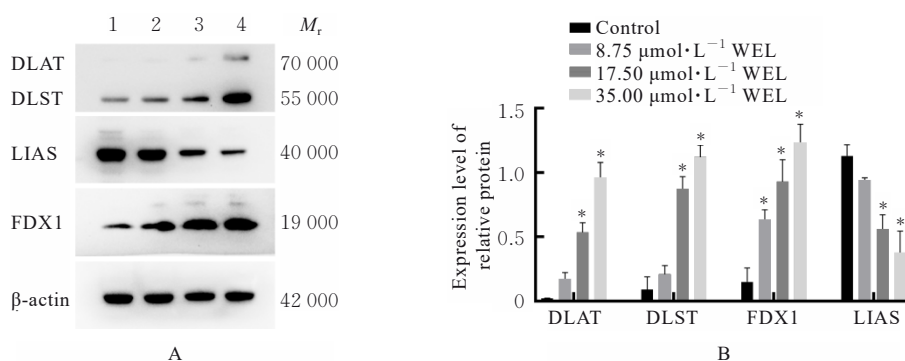


图5 各组PANC-1细胞中DLAT蛋白表达和定位情况

Fig. 5 Expression and localization of DLAT in PANC-1 cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: $8.75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group; Lane 3: $17.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group; Lane 4: $35.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ WEL group. * $P < 0.01$ compared with control group.

图6 各组PANC-1细胞中DLAT、DLST、FDX1和LIAS蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of DLAT, DLST, FDX1, and LIAS proteins in PANC-1 cells in various groups

WEL能够显著上调铜死亡关键蛋白DLAT、DLST和FDX1的表达,同时抑制LIAS蛋白的表达。上述结果表明:WEL能够通过激活FDX1蛋白促使脂酰化蛋白聚集,引发蛋白质毒性应激,最终诱导PANC-1细胞发生铜死亡。

综上所述,WEL具有良好的抗肿瘤活性,在

保护胰腺损伤方面有巨大的潜力。本研究为WEL的抗胰腺癌作用提供了可靠的实验证据,初步揭示了其通过铜死亡通路发挥效应的分子机制。这一研究结果为WEL与化疗药物联合用药减轻化疗药物毒性奠定了前期研究基础,有望为胰腺癌的治疗开辟新的方向。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李雨欣参与实验设计、实验操作、数据收集、统计学分析和论文撰写, 杨露参与实验操作、数据收集和统计学分析, 李凤金和齐玲参与实验设计及论文审阅。

[参考文献]

- [1] 谢昊, 姜琳, 许治清, 等. 可能增加胰腺癌风险的药物研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2025, 45(1): 92-98.
- [2] CONROY T, PFEIFFER P, VILGRAIN V, et al. Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2023, 34(11): 987-1002.
- [3] 史欣悦, 赵梅玉, 周妹伶, 等. 蟛蜞菊内酯药理作用及机制研究进展[J]. 广东化工, 2024, 51(3): 93-96.
- [4] LI H, HOU M T, ZHANG P, et al. Wedelolactone suppresses breast cancer growth and metastasis via regulating TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(8): 1038-1050.
- [5] ZOU Y X, MU Z Q, WANG J, et al. Wedelolactone, a component from *Eclipta prostrata* (L.) L., inhibits the proliferation and migration of head and neck squamous cancer cells through the AhR pathway [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2022, 23(15): 1883-1892.
- [6] JIANG H, NIU C Q, GUO Y Q, et al. Wedelolactone induces apoptosis and pyroptosis in retinoblastoma through promoting ROS generation [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 111: 108855.
- [7] SINGH M, BANSAL S, KUNDU S, et al. Synthesis, structure-activity relationship, and mechanistic investigation of lithocholic acid amphiphiles for colon cancer therapy[J]. Medchemcomm, 2015, 6(1): 192-201.
- [8] BAGNOLI S, TERZIBASI TOZZINI E, CELLERINO A. EdU and Immunofluorescence staining of nothobranchius furzeri organotypic cultures [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2023, 2023(3): 107790.
- [9] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL P D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, 2018(6): 2018/6/pdb.prot095497.
- [10] ZHANG W L, HE X, YIN H L, et al. Allosteric activation of the metabolic enzyme GPD1 inhibits bladder cancer growth via the lysoPC-PAFR-TRPV2 axis [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 93.
- [11] 姜 珊, 刘 森, 张 黎, 等. 蟛蜞菊内酯通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路诱导人胰腺癌 A549 细胞凋亡 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2021, 50(4): 488-492.
- [12] 李岩溪. 天然产物蟛蜞菊内酯靶向 β -catenin 诱导结肠癌细胞凋亡的作用机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [13] 陈 涵, 张 黎, 王昱冕, 等. 铜死亡发生机制及其在心血管疾病发生发展中的作用研究进展 [J]. 山东医药, 2024, 64(5): 85-88.
- [14] 单关月, 万 慧, 张雨欣, 等. 铜死亡的作用机制及在肝脏疾病中的研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2023, 27(12): 1493-1496.
- [15] YANG W C, WANG Y X, HUANG Y Z, et al. 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to promote cuproptosis in colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 159: 114301.
- [16] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. Science, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [17] ELEFANTOVA K, LAKATOS B, KUBICKOVA J, et al. Detection of the mitochondrial membrane potential by the cationic dye JC-1 in L1210 cells with massive overexpression of the plasma membrane ABCB1 drug transporter [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 1985.
- [18] HAIDER S Z, MOHANRAJ N, MARKANDEYA Y S, et al. Picture perfect: Imaging mitochondrial membrane potential changes in retina slices with minimal stray fluorescence [J]. Exp Eye Res, 2021, 202: 108318.
- [19] DREISHPOON M B, BICK N R, PETROVA B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS [J]. bioRxiv, 2023: 2023.02.03.526472.
- [20] MA H Y, GE Y Z, LI Y H, et al. Construction of a prognostic model based on cuproptosis-related genes and exploration of the value of DLAT and DLST in the metastasis for non-small cell lung cancer [J]. Medicine (Baltimore), 2024, 103(49): e40727.
- [21] YIN Q, YAO Y Y, NI J J, et al. DLAT activates EMT to promote HCC metastasis by regulating GLUT1-mediated aerobic glycolysis [J]. Mol Med, 2025, 31(1): 71.
- [22] LEI G, SUN M C, CHENG J, et al. Radiotherapy promotes cuproptosis and synergizes with cuproptosis inducers to overcome tumor radioresistance [J]. Cancer Cell, 2025, 43(6): 1076-1092.
- [23] 吴 琳, 亓同钢. 铜死亡相关基因 LIAS: 疾病机制与治疗新方向 [J]. 临床医学进展, 2025, 15(3): 621-628.