

# 低强度脉冲超声协同冬凌草甲素通过激活 PIEZO1 诱导胰腺癌细胞铁死亡的机制

孙陞航<sup>1</sup>, 郭煜君<sup>1</sup>, 祁玉麟<sup>2</sup>, 姚丹<sup>1</sup>, 陈文直<sup>1</sup>, 陈念芝<sup>1</sup>

<sup>1</sup>重庆医科大学超声医学工程国家重点实验室//生物医学工程学院, 重庆 400016; <sup>2</sup>成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075

**摘要:**目的 基于铁死亡探讨冬凌草甲素(Ori)对胰腺癌的影响,以及低强度脉冲超声(LIPUS)在协同增效中的作用机制。方法 体外实验首先分为对照组、不同浓度的Ori组,通过CCK-8法检测不同浓度Ori对PANC-1增殖活力的影响。其次实验分为对照组、Ori组,通过流式细胞术检测细胞内Fe<sup>2+</sup>、ROS含量,试剂盒检测细胞内二醛(MDA)、而谷胱甘肽(GSH)和三磷酸腺苷(ATP)浓度,Western blotting检测细胞内GPX4、Nrf2、HO-1蛋白表达。随后分为对照组、铁死亡抑制剂组(Fer-1)、Ori组以及Ori联合Fer-1组,通过CCK-8法检测各组对PANC-1增殖活力的影响。最后分为对照组、Ori组、LIPUS组及联合组,通过Western blotting检测细胞内PIEZO1蛋白表达。体内实验构建C57BL/6J小鼠胰腺癌模型,实验分组分为对照组、Ori组、LIPUS组及联合组,通过检测皮下移植瘤小鼠肿瘤的苏木精-伊红染色(HE)、免疫组织化学Ki67染色评估肿瘤组织病理变化及细胞增殖活性,Western blotting及免疫荧光染色(IF)检测小鼠肿瘤内GPX4表达。**结果** 与对照组相比,Ori可以抑制PANC-1细胞增殖( $P<0.001$ ),细胞内Fe<sup>2+</sup>、ROS、MDA升高( $P<0.05$ ),GSH和ATP下降( $P<0.001$ )。与对照组相比,Ori组GPX4蛋白表达下降( $P<0.01$ ),HO-1、Nrf2蛋白表达升高( $P<0.05$ )。与Ori组相比,Ori联合LIPUS组细胞活力下降( $P<0.01$ )。比较各组皮下移植瘤小鼠肿瘤发现,与Ori组相比,Ori联合LIPUS组进一步抑制肿瘤的生长( $P<0.01$ )。Ki67染色表明联合组相较于Ori组细胞增殖活性更弱。与Ori组相比,联合组GPX4蛋白表达及荧光强度均更低( $P<0.05$ )。与对照组相比,LIPUS组和Ori组PIEZO1蛋白表达均升高( $P<0.005$ ),与Ori组相比,联合组PIEZO1蛋白表达升高更为显著( $P<0.01$ )。**结论** LIPUS协同Ori通过激活PIEZO1,通过Nrf2/HO-1/GPX4通路促进胰腺癌细胞铁死亡。

**关键词:** 低强度脉冲超声;冬凌草甲素;铁死亡;PIEZO1;胰腺癌

## Low-intensity pulsed ultrasound and oridonin synergistically induce ferroptosis of pancreatic cancer cells by activating PIEZO1 via the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway

SUN Bihang<sup>1</sup>, GUO Yujun<sup>1</sup>, QI Yulin<sup>2</sup>, YAO Dan<sup>1</sup>, CHEN Wenzhi<sup>1</sup>, CHEN Nianzhi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>2</sup>Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

**Abstract: Objective** To evaluate the inhibitory effect of oridonin against proliferation of pancreatic cancer cells and the mechanism underlying the synergistic effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS). **Methods** PANC-1 cells treated with different concentrations of oridonin were examined for changes in cell proliferation using CCK-8 assay and in MDA, GSH and ATP levels using flow cytometry. The protein expressions of GPX4, Nrf2 and HO-1 in the treated cells were detected with Western blotting. The effect of Fer-1, a ferroptosis inhibitor, on proliferation of oridonin-treated cells were assessed, and the effects of oridonin combined with LIPUS on PIEZO1 protein expression was evaluated using Western blotting. A C57BL/6J mouse model bearing pancreatic cancer cell xenograft was established and treated with oridonin, LIPUS, or both, and the histological changes in the tumor tissues and tumor cell proliferation were examined with HE staining and immunohistochemistry for Ki67; the changes in GPX4 expression in the tumor tissues were detected using Western blotting and immunofluorescence staining. **Results** In PANC-1 cells, oridonin treatment significantly inhibited cell proliferation, increased intracellular Fe<sup>2+</sup>, ROS, and MDA levels, and decreased GSH and ATP levels. Oridonin also resulted in lowered GPX4 and increased HO-1 and Nrf2 protein expression levels in the cells. The combined treatment with LIPUS significantly enhanced the inhibitory effect of oridonin on PANC-1 cell viability *in vitro* and on xenograft growth in the mouse models, resulting also in more obvious reduction of the intensity of Ki67 staining and GPX4 protein expression and more pronounced increase of PIEZO1 protein expression in the tumor tissues in the mouse models. **Conclusion** LIPUS enhances the effect of oridonin to promote ferroptosis of pancreatic cancer cells by activating PIEZO1 through the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway.

**Keywords:** low-intensity pulsed ultrasound; oridonin; ferroptosis; piezo1; pancreatic cancer

收稿日期:2025-07-11

基金项目:中国博士后科学基金项目(2023MD734135);重庆市博士后科学基金项目(CSTB2023NSCQ-BHX0019)

作者简介:孙陞航,在读硕士研究生,E-mail: 2023111943@stu.cqmu.edu.cn

通信作者:陈念芝,博士后,E-mail: saber930607@163.com;陈文直,教授,E-mail: chenwz@haifu.com.cn

胰腺癌是一种高度恶性、预后极差且具有高耐药性的消化系统肿瘤,也是全球癌症死亡的主要原因之一。在我国,其发病率位居各类癌症第10位,但死亡率却高居第6位<sup>[1,2]</sup>。由于多数患者确诊时已处于中晚期,丧失了手术根治的机会<sup>[3,4]</sup>。而肿瘤本身的耐药性又导致许多药物疗效不佳。现有的放疗、化疗等治疗手段效果有

限,且伴随的不良反应不容忽视<sup>[5]</sup>。因此,寻找新型药物和治疗策略是当前迫切的需求。中医药作为一个蕴藏丰富潜力的药物宝库,在胰腺癌治疗领域展现出一定的潜力<sup>[6,7]</sup>。中药以其药性温和、不良反应少的特点受到广泛关注,挖掘更多有效的中药治疗方案已成为临床亟需解决的问题。

在众多具有抗胰腺癌潜力的中草药中,冬凌草备受关注。该草药于20世纪70年代初的中草药资源普查中被发现,传统上用于清热解毒等症<sup>[8]</sup>。临床研究显示,冬凌草可用于治疗喉炎、口腔炎,并在食管癌、结肠癌等肿瘤治疗中表现出一定疗效<sup>[9]</sup>。其关键活性成分——冬凌草甲素(Ori)是一种萜类化合物,因显著的抗炎和抗癌活性而成为研究热点<sup>[10]</sup>。研究表明,Ori的抗癌机制可能涉及:诱导细胞内活性氧(ROS)水平变化、调节p53及细胞外信号调节激酶(ERK)通路、以及通过线粒体途径触发细胞凋亡<sup>[11,12]</sup>。已有研究表明,Ori能在胃癌、乳腺癌、黑色素瘤等肿瘤中通过促进肿瘤细胞铁死亡来抑制肿瘤进展<sup>[13-15]</sup>,但Ori在胰腺癌治疗中的相关证据仍较为有限<sup>[16]</sup>。

铁死亡是一种Fe<sup>2+</sup>依赖性的细胞死亡方式,其核心特征包括氧化应激、脂质过氧化以及特定的调控通路异常<sup>[17]</sup>。具体而言,细胞内铁离子积累会催化Fenton反应,产生高活性自由基,如羟自由基和ROS。这些活性物质攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,生成脂质过氧化物MDA。与此同时,GPX4利用GSH还原脂质过氧化物,维持细胞氧化还原稳态。当GSH耗竭时,GPX4活性下降,导致脂质过氧化物累积,从而驱动铁死亡进程。此外,ROS的过度积累还会损伤线粒体功能,减少ATP生成<sup>[17-19]</sup>。研究表明,诱导铁死亡能够抑制肿瘤生长并促进肿瘤内免疫反应<sup>[20,21]</sup>,值得注意的是,已有证据表明促进铁死亡可有效抑制胰腺癌的生长<sup>[22]</sup>。

此外,Ori水溶性低、口服生物利用度差,成为限制其临床应用的主要障碍<sup>[23]</sup>。低强度脉冲超声(LIPUS)是一种安全无创的物理治疗手段。研究显示,联合应用LIPUS可有效提升药物的利用率<sup>[24-26]</sup>,因此,探索Ori治疗胰腺癌的具体机制,并验证联合LIPUS能否增强其抗肿瘤效果,具有重要意义。本研究旨在揭示Ori对胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其潜在分子机制;同时,进一步验证LIPUS能否通过协同作用增强Ori的抗癌效果。本研究将为Ori治疗胰腺癌提供关键的临床前数据与理论依据,并为提高中药活性成分的生物利用度提供新策略。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

人胰腺癌PANC-1细胞,小鼠胰腺癌panc02细胞(上海富衡生物科技有限公司),使用DMEM完全培养基(含10%胎牛血清,1%双抗),在37℃,5%CO<sub>2</sub>的细胞

培养箱中培养。

### 1.2 动物

6~8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠40只,体质量(20±2)g,由重庆恩斯维尔生物科技有限公司提供,合格证号为:SCXK(湘)2021-0002,饲养于重庆医科大学SPF级实验动物中心,实验动物饲养许可证:SYXK(渝)2022-0016。12h光照/12h无光照环境,室内温度在(25±1)℃,相对湿度40%~70%,普通饲料喂养,自由饮食饮水。本实验由重庆医科大学实验动物管理和使用委员会审批(伦理批号:IACUC-CQMU-2024-0002)。

### 1.3 药品及试剂

冬凌草甲素、Ferrostatin-1(上海陶术生物科技有限公司);胎牛血清、DMEM培养基、青霉素-链霉素溶液、磷酸盐缓冲液(PBS,南京生航生物技术有限公司);0.25%胰酶消化液(Gibco);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(APEXBio);BCA蛋白浓度检测试剂盒、活性氧检测试剂、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY)、ATP检测试剂盒、总谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒、Western一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)一抗、核因子-E2相关因子2(Nrf2)一抗、血红素氧合酶-1(HO-1)一抗、压电型机械敏感离子通道组件1(Piezo1)一抗(武汉三鹰生物技术有限公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、β-肌动蛋白(β-actin)抗体、HRP辣根酶标记的山羊抗兔二抗(江苏亲科生物研究中心有限公司);苏木素染液,伊红染液、增殖细胞核抗原(PCNA)抗体、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、CY3山羊抗兔IgG(武汉塞维尔生物科技有限公司)。

### 1.4 仪器

细胞培养箱(Thermo),低温离心机(青岛海特生物医疗有限公司),倒置光学显微镜(OLYMPUS),酶标仪(Tecan),凝胶成像系统(Azure),垂直电泳仪、转印槽、通用电泳仪电源(BIO-RAD),流式细胞仪(BD),低强度脉冲超声设备(重庆融海超声医学工程研究中心有限公司)。

### 1.5 方法

1.5.1 细胞培养 人胰腺癌PANC-1和小鼠胰腺癌panc02细胞在DMEM完全培养基(10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素溶液)中培养,培养条件为37℃,5%CO<sub>2</sub>,2d/次。

1.5.2 动物分组及造模 40只C57BL/6小鼠适应性饲养1周之后,备皮,在背部注射200μL含有panc02细胞(2×10<sup>6</sup>)的PBS细胞悬液。约5d后,肿瘤直径约为5mm时,模型视为构建成功,共选择32只肿瘤大小相近的小鼠进行分组,随机分为对照组,LIPUS组,Ori组及Ori联

合LIPUS组( $n=8$ )。对照组小鼠每日腹腔注射200  $\mu\text{L}$  无菌PBS, Ori组每日腹腔注射10 mg/kg的Ori溶液200  $\mu\text{L}$ , LIPUS组小鼠每日在肿瘤处辐照10 min, Ori联合LIPUS组小鼠在打药完成后即刻进行超声辐照, 治疗持续14 d。

**1.5.3 超声参数设置** 根据课题组前期实验结果, 超声频率设置为350 kHz, 重复频率1 kHz, 占空比20%。LIPUS-1组强度为200  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , LIPUS-2强度为400  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 细胞辐照时间为2 min, 动物辐照时间10 min。

**1.5.4 CCK-8检测** 细胞增殖活力将对数生长的PANC-1细胞接种于96孔板中( $1 \times 10^4$ /孔), 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的Ori(1、2、5、10、20、40、60、80、100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), 6个复孔组; 使用Ferrostatin-1时, 分为对照组, Ori组(20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), Fer-1组(50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), Ori联合Fer-1组(浓度分别为20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、50  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ); 联合LIPUS时, 分为对照组, LIPUS-1, LIPUS-2, Ori联合LIPUS-1及Ori联合LIPUS-2组, 加入Ori后, 立即用LIPUS进行辐照。Ori与细胞共同孵育24 h后, 将DMEM完全培养基与CCK-8试剂以10:1的比例混合加入孔中, 细胞培养箱孵育1.5 h后, 酶标仪测定吸光度 $A_{450\text{nm}}$ , 根据公式:  $(A_{\text{冬凌草甲素组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$  计算细胞活力。

**1.5.5 流式细胞术检测 $\text{Fe}^{2+}$ 和ROS含量** 将对数生长期的PANC-1细胞接种于6孔板中( $5 \times 10^5$ /孔), 实验分为对照组和Ori组(20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )。细胞贴壁后加入Ori, 共同孵育24 h后, 胰蛋白酶消化3 min, 收集细胞, 1200 r/min离心3 min, PBS洗涤, 根据说明书推荐比例加入 $\text{Fe}^{2+}$ 及ROS染色试剂, 室温染色30 min后上机检测, Flow Jo分析结果。

**1.5.6 二醛(MDA)、而谷胱甘肽(GSH)和三磷酸腺苷(ATP)检测** 细胞铺板及分组同2.5, 细胞贴壁后加入Ori作用24 h, 弃上清, 加入裂解液冰上裂解10 min, 12 000 r/min离心10 min, 取上清, 进行后续检测, 对于GSH检测, 用胰蛋白酶消化细胞后, 收集细胞, 根据细胞沉淀体积加入相应蛋白去除试剂, 液氮反复冻融2次, 离心, 收集上清进行GSH测定。根据说明书公式进行检测及统计计算。

**1.5.7 BODIPY 581/591 C11检测** 细胞铺板及分组同2.5, 细胞贴壁后加入Ori作用24 h后吸除培养液, 用PBS洗涤细胞1次, 加入1 mL BODIPY 581/591 C11染色工作液后于细胞培养箱中37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min。孵育结束后, 吸除上清, 用PBS洗涤2次, 加入PBS后在共聚焦显微镜下观察。

**1.5.8 蛋白免疫印迹法(WB)检测蛋白表达** 细胞铺板及分组同2.5, Ori(20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )干预24 h后, 弃培养基, 预冷PBS洗2次, 加入含1%PMSF的裂解液, 冰上裂解10

min后, 收集细胞, 12 000 r/min离心10 min, 取上清进行BCA蛋白浓度定量, 根据结果加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 100  $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min, 冷却到室温后-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存或进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿法转膜后, 5%脱脂牛奶封闭1 h, TBST洗涤3次, 加入GPX4、Nrf2、HO-1、GAPDH一抗(一抗与稀释液比例均为1:1000)4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜过后TBST洗涤3次, 加入HRP辣根酶标记的山羊抗兔二抗(1:5000)摇床孵育1.5 h后, TBST洗涤3次, 利用化学发光成像仪进行显影。Image J分析条带灰度值, GraphPad Prism 10进行统计分析。

**1.5.9 测量小鼠体质量、肿瘤大小及肿瘤质量** 治疗期间, 2 d次小鼠体质量和肿瘤长径a, 短径b, 肿瘤体积V根据公式 $V=0.52ab^2$ 进行计算, 实验终点时, 脱颈处死小鼠, 取肿瘤称质量。最后用GraphPad Prism进行统计分析。

**1.5.10 苏木素-伊红(HE)染色** 小鼠肿瘤用PBS清洗之后, 放入4%多聚甲醛溶液固定, 经脱水、透明、包埋、切片、脱蜡与复水后, 将切片浸入苏木素溶液中, 分化、返蓝之后, 将切片浸入伊红溶液, 最后脱水、透明、封片, 置于光学显微镜下观察。

**1.5.11 免疫组化(IHC)染色** 肿瘤处理同2.9, 脱蜡复水之后, 进行抗原修复, 3%BSA封闭30 min, 滴加Ki67抗体(1:400), 随后将切片置于湿盒中, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日将切片置于PBS溶液中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次后, 滴加HRP标记的山羊抗兔二抗, 避光室温孵育。DAB显色, 最后复染细胞核, 经脱水封片后在光学显微镜下观察和拍摄, Image J分析, GraphPad Prism 10统计。

**1.5.12 免疫荧光(IF)染色** 肿瘤处理同2.9, 脱蜡复水之后, 进行抗原修复、3%BSA封闭30 min, 滴加GPX4抗体(1:400), 切片置于湿盒中4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日将切片置于PBS溶液中, 在脱色摇床上晃动洗涤3次后, 滴加荧光标记的山羊抗兔二抗, 避光室温孵育1 h。最后滴加DAPI染细胞核, 滴加抗荧光淬灭剂, 封片。在光学显微镜或荧光显微镜下观察和拍摄, Image J分析, GraphPad Prism 10统计。

**1.5.13 统计学分析** 采用GraphPad Prism 10进行统计分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示。两组间比较使用t检验, 多组间比较使用单因素方差分析,  $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ori抑制PANC-1细胞增殖活力

与对照组比较, Ori组细胞活力呈浓度依赖性下降, Ori显著抑制PANC-1细胞增殖。计算得出Ori的 $\text{IC}_{50}$ 值约为17.02  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , 当Ori浓度为10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 细胞活力抑制率约33%, 当浓度为20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 抑制率约为63%, 故选用浓度为20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的Ori进行后续实验( $P < 0.001$ , 图1)。

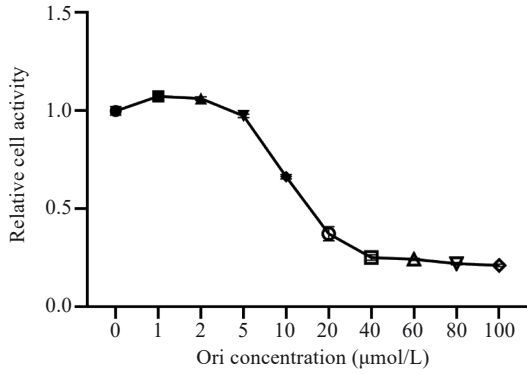


图1 不同Ori浓度对PANC-1活力的影响  
Fig.1 Effect of different concentrations of oridonin (Ori) on proliferation of PANC-1 cells (n=6).

### 2.2 Ori促进PANC-1铁死亡 Ori促进PANC-1细胞内Fe<sup>2+</sup>升高

流式细胞术显示,与对照组相比,Ori(20 μmol/L)作用后PANC-1细胞内Fe<sup>2+</sup>增加(P<0.001,图2)。Ori促进PANC-1细胞内ROS升高。与对照组相比,Ori(20 μmol/L)组细胞内ROS表达上升(P<0.01,图3)。

此外,通过使用Ori联合铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(Fer-1)来观察PANC-1细胞活力的变化,与对照组相比,Fer-1组细胞活力无明显变化,Ori组细胞活力下降显著,联合Fer-1之后,其细胞活力较Ori组稍高,且有统计学意义(P<0.05,图4)。

### 2.3 Ori通过GPX4、HO-1、Nrf2通路靶向诱导PANC-1铁死亡

Ori调控铁死亡相关标志物MDA、GSH、ATP的表达。与对照组相比,用20 μmol/L的Ori处理后,细胞内脂质氧化物MDA的表达上升;而GSH和ATP表达下降(P<0.05,图5)。同时,WB结果显示,Ori调控细胞内铁死亡相关蛋白GPX4、HO-1、Nrf2的表达,与对照组比较,Ori组GPX4和Nrf2蛋白表达下降,而HO-1蛋白表达增加(P<0.01,图6)。此外,共聚焦显微镜检测C11-BODIPY荧光探针的结果显示,经Ori处理的PANC-1细胞中,还原态探针(红色荧光)信号强度显著减弱,而氧化态探针(绿色荧光)信号强度显著增强(图7)。该荧光信号转换表明,Ori处理显著诱导了PANC-1细胞内

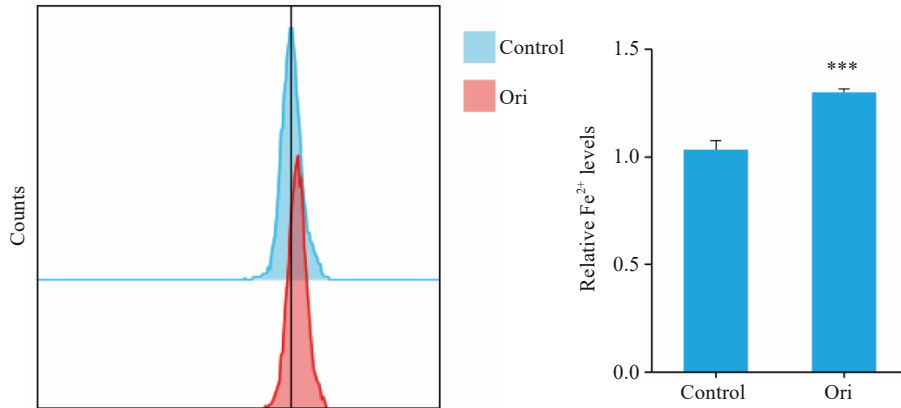


图2 Ori处理后PANC-1细胞内Fe<sup>2+</sup>水平  
Fig.2 Effect of Ori on intracellular Fe<sup>2+</sup> level in PANC-1 cells (n=3). \*\*\*P<0.001 vs Control.

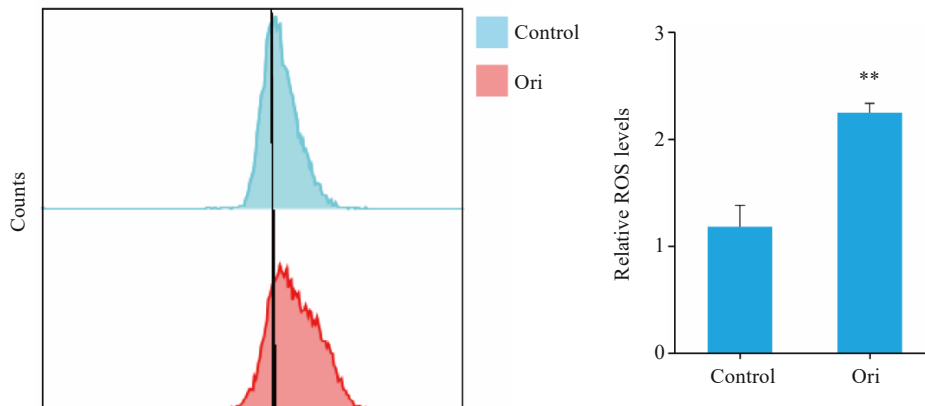


图3 Ori处理后PANC-1细胞内ROS水平  
Fig.3 Effect of Ori on intracellular ROS level (n=3). \*\*P<0.01 vs Control.

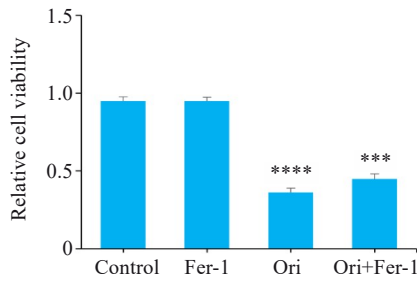


图4 Ori联合Fer-1对PANC-1活力的影响  
Fig. 4 Effect of Ori combined with Fer-1 on proliferation of PANC-1 cells ( $n=6$ ). \*\*\*\* $P<0.001$  vs Control, \*\*\* $P<0.005$  vs Ori Group.

脂质过氧化产物的积累。

#### 2.4 LIPUS协同Ori促进PANC-1细胞铁死亡

与对照组相比, LIPUS-1组(200 mW/cm<sup>2</sup>)和LIPUS-2组(400 mW/cm<sup>2</sup>)细胞活力差异无统计学意义。当LIPUS-1组联合Ori时,与对照组相比,细胞活力下降显著,但是与Ori组相比,差异无统计学意义。当LIPUS-2组联合Ori时,与Ori组相比,联合组细胞活力进一步下降,且差异有统计学意义( $P<0.01$ ,图8)。

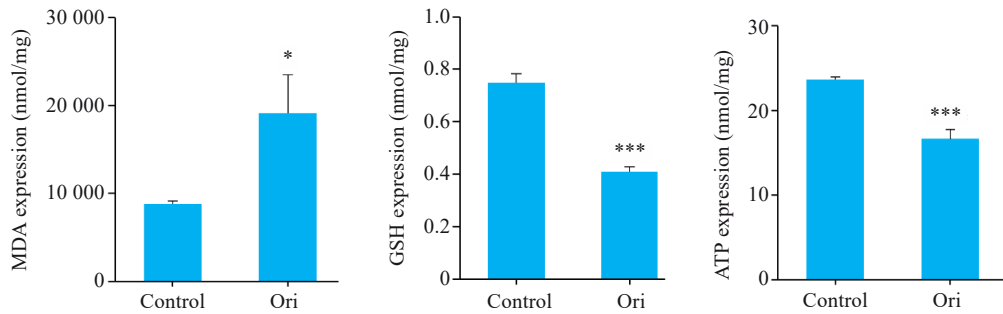


图5 Ori处理后PANC-1细胞内MDA、GSH、ATP表达  
Fig. 5 Effect of Ori on intracellular MDA, GSH, and ATP levels in PANC-1 cells ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$  vs Control.

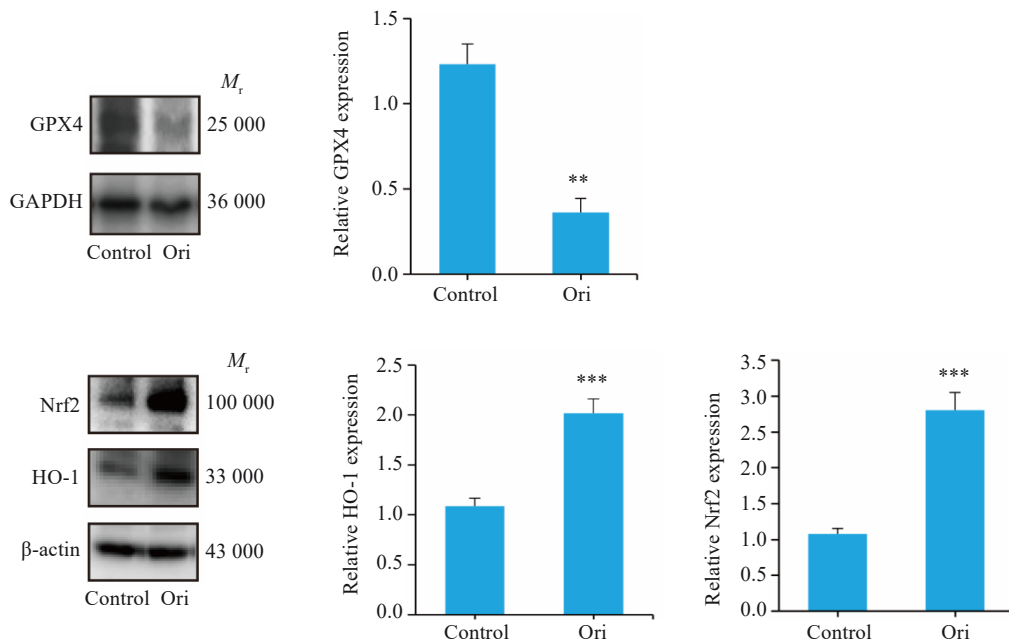


图6 Ori处理后PANC-1细胞内GPX4、Nrf2、HO-1蛋白表达  
Fig. 6 Effect of Ori on intracellular GPX4, Nrf2, and HO-1 expressions in PANC-1 cells ( $n=3$ ). \*\* $P<0.001$ , \*\*\* $P<0.005$  vs Control.

#### 2.5 LIPUS协同Ori促进胰腺癌小鼠PANC-1铁死亡

WB结果显示,对照组和LIPUS组GPX4表达无明显差异, Ori组和LIPUS+Ori组表达下降。而与Ori组相比,联合组GPX4蛋白的表达更低( $P<0.01$ ,图9)。免

疫荧光显示,对照组与LIPUS组红色荧光(GPX4)强度差异不明显, Ori组和LIPUS+Ori组红色荧光强度低于对照组,而LIPUS+Ori组红色荧光强度低于Ori组( $P<0.01$ ,图10)。

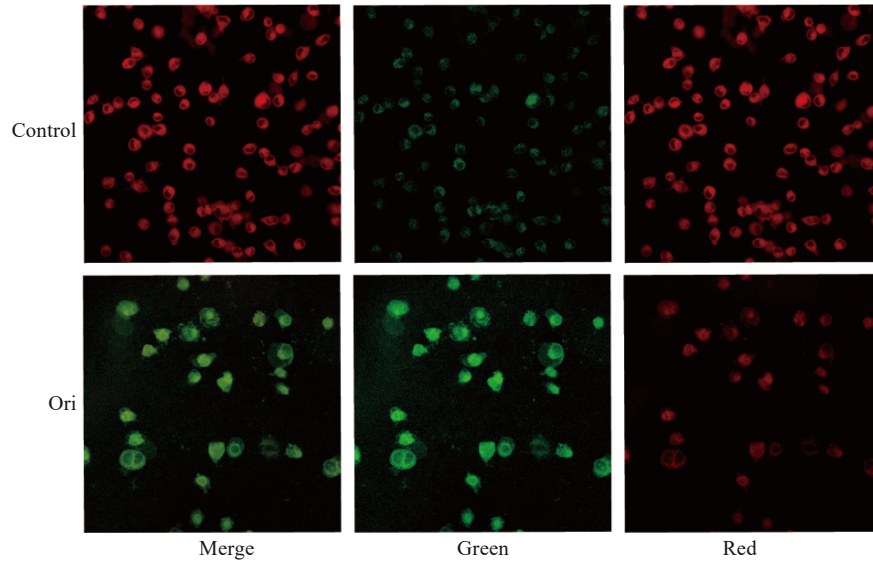


图7 Ori处理后PANC-1细胞内C11-BODIPY标记荧光强度

Fig. 7 Fluorescence intensity of C11-BODIPY labeling in PANC-1 cells after Ori treatment (Original magnification:  $\times 40$ ) ( $n=3$ ).

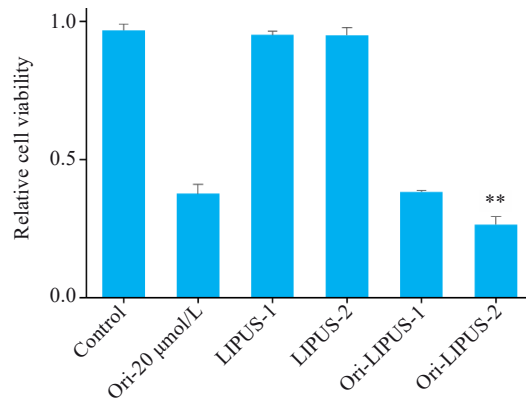


图8 Ori联合LIPUS对PANC-1细胞活力影响

Fig. 8 Effect of Ori combined with LIPUS on proliferation of PANC-1 cells ( $n=6$ ). \*\* $P<0.01$  vs Ori-20  $\mu\text{mol/L}$ .

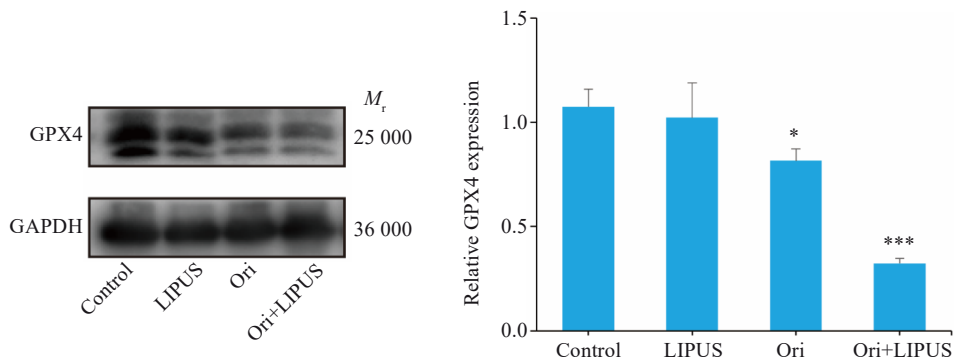


图9 Ori联合LIPUS处理后小鼠肿瘤内GPX4表达

Fig. 9 Effect of Ori combined with LIPUS on intra-tumoral GPX4 expression in the mouse models ( $n=3$ ). \* $P<0.05$  vs Control, \*\*\* $P<0.005$  vs Ori.

### 2.6 LIPUS联合Ori对胰腺癌小鼠体质量的影响

第14天时,各组小鼠体质量之间差异无统计学意义,但是与各自造模前相比,体质量上升( $P<0.01$ ,图11)。

### 2.7 LIPUS联合Ori抑制胰腺癌小鼠肿瘤生长

第14天时,对照组与LIPUS组小鼠肿瘤体积差异无统计学意义。与对照组相比,Ori组和LIPUS+Ori组

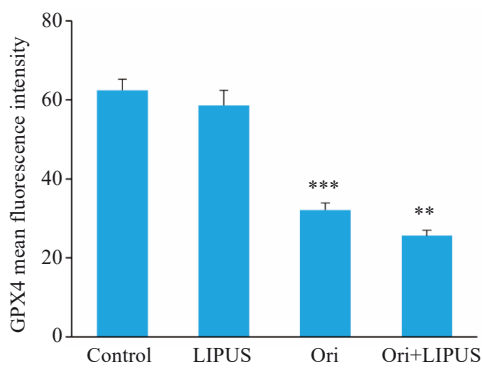
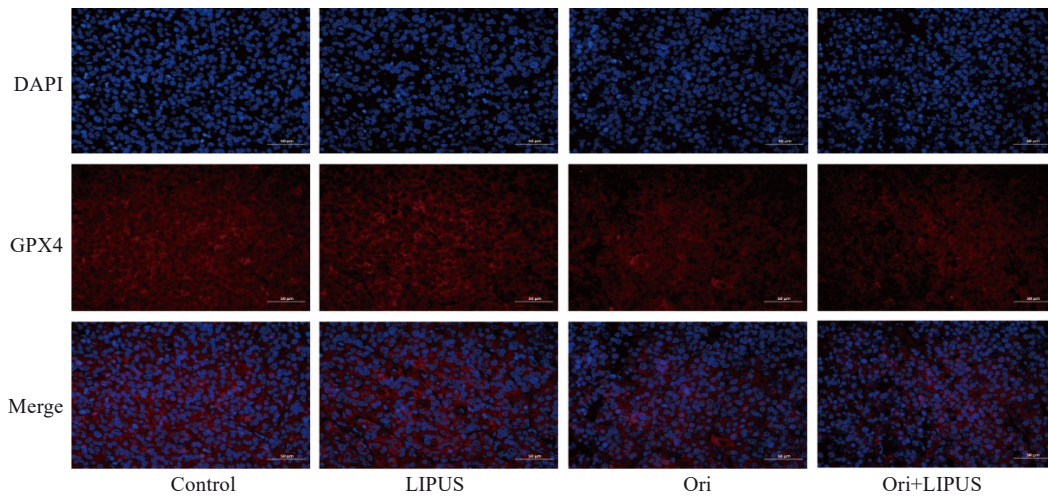


图 10 Ori联合LIPUS处理后小鼠肿瘤内GPX4平均荧光强度

Fig. 10 Effect of Ori combined with LIPUS on intra-tumoral GPX4 mean fluorescence intensity in the mouse models (×20) (n=3) (scale bar=50 μm). \*\*\*P<0.001 vs Control, \*\*P<0.01 vs Ori.

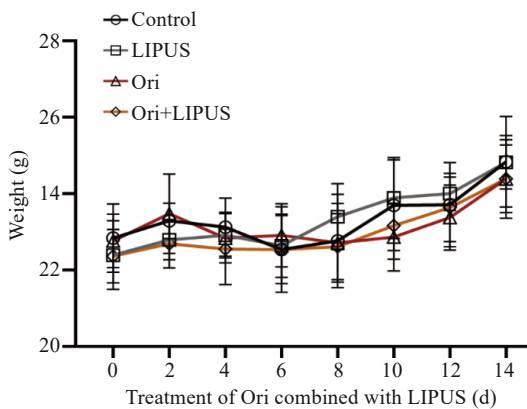


图 11 Ori联合LIPUS对胰腺癌小鼠体质量的影响

Fig. 11 Effect of Ori combined with LIPUS on body weight of the mouse models bearing pancreatic cancer xenograft (n=8).

肿瘤体积明显更小,同时,与Ori组相比,LIPUS+Ori组肿瘤体积更小,且有统计学差异。同时取小鼠肿瘤进行称质量,LIPUS组与对照组相比无明显差异。与对照组相比,Ori组和LIPUS+Ori组肿瘤质量更轻。与Ori组相比,LIPUS+Ori组肿瘤质量小于Ori组(P<0.01,图12)。LIPUS联合Ori促进胰腺癌小鼠肿瘤坏死。取小鼠肿瘤做病理切片染色,HE染色结果显示,所有组别小鼠肿瘤均存在坏死现象,与对照组相比,LIPUS组坏死程度差异不明显,Ori组坏死程度更大,LIPUS+Ori组坏死程度最大。Ki67染色显示,对照组与LIPUS阳性率

无明显差异,Ori组阳性率下降,LIPUS+Ori组Ki67阳性率最低(P<0.01,图13)。

### 2.8 LIPUS促进胞内Fe<sup>2+</sup>积累

与对照组相比,LIPUS-1组和LIPUS-2组细胞内Fe<sup>2+</sup>均多于对照组,且差异有统计学意义(P<0.01,图14)。

### 2.9 LIPUS协同Ori促进PIEZO1表达

WB结果显示,与对照组比较,LIPUS组、Ori组和LIPUS+Ori组PIEZO1蛋白表达均升高,其中LIPUS+Ori组升高更为显著,且差异具有统计学意义(P<0.05,图15)。

## 3 讨论

本研究首先采用CCK-8法检测了Ori对胰腺癌细胞PANC-1的增殖抑制作用。结果显示,Ori处理PANC-1细胞的IC<sub>50</sub>值为17.02 μmol/L。在20 μmol/L浓度下,Ori对细胞活力的抑制率达到63%,显著高于10 μmol/L浓度下的抑制率(33%)。因此,后续实验选用20 μmol/L作为Ori的工作浓度。流式细胞术分析显示,经Ori处理后,PANC-1细胞内的Fe<sup>2+</sup>水平和ROS含量均显著升高,表明Ori诱导了细胞内的铁代谢紊乱和氧化应激。与铁死亡的特征相符,在Ori作用下,细胞内MDA含量升高而ATP含量下降。进一步检测发现,GSH含量也显著降低,这与铁死亡相关研究报道一致<sup>[17,27]</sup>。此外,共聚焦显微镜检测C11-BODIPY荧光探

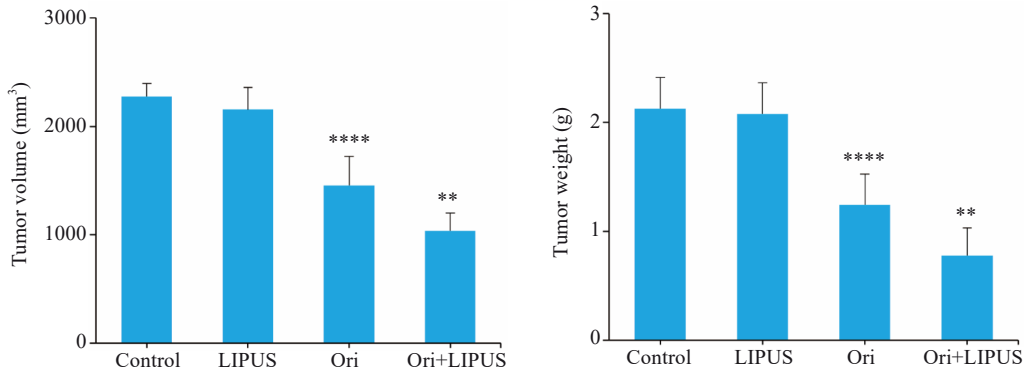


图12 Ori联合LIPUS对胰腺癌小鼠肿瘤体积及体质量影响

Fig.12 Effect of LIPUS combined with Ori on tumor volume and weight in the tumor-bearing mice ( $n=8$ ). \*\*\*\* $P<0.001$  vs Control, \*\* $P<0.01$  vs Ori.

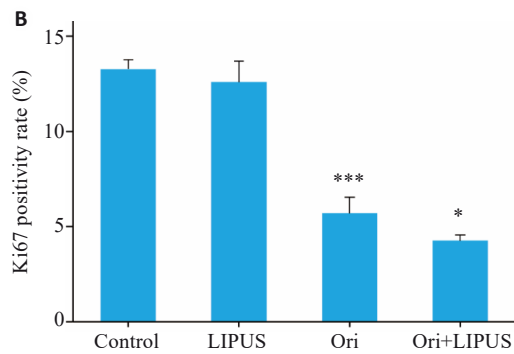
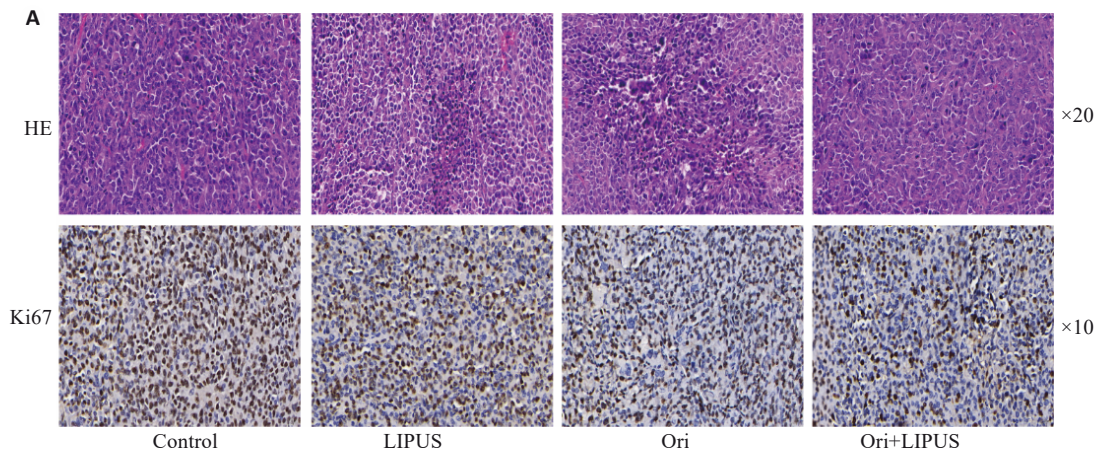


图13 小鼠肿瘤组织HE和Ki67染色

Fig.13 HE and Ki67 staining of mouse tumor tissues (A) and statistical results of Ki67 positivity rates in different groups (B;  $n=3$ ). \*\*\* $P<0.001$  vs Control, \* $P<0.05$  vs Ori.

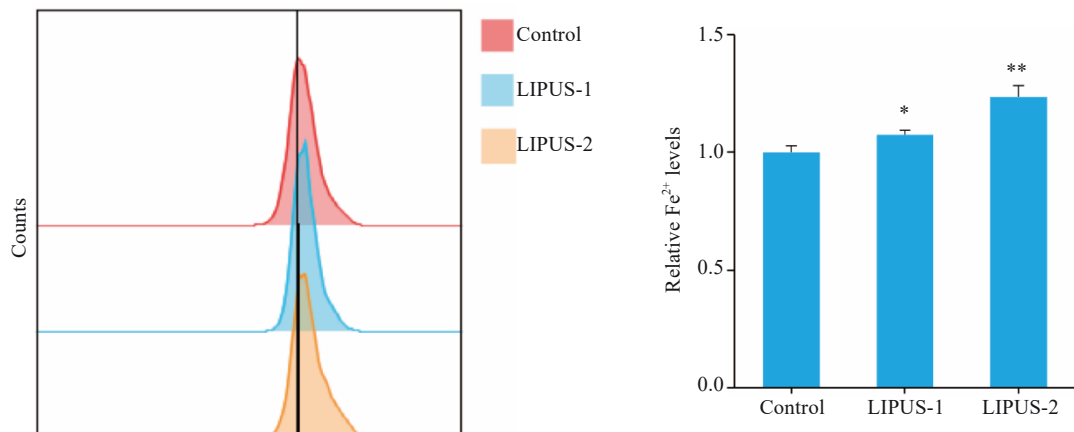


图14 LIPUS处理后PANC-1细胞内Fe<sup>2+</sup>水平

Fig.14 Effect of LIPUS on intracellular Fe<sup>2+</sup> level ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs Control.

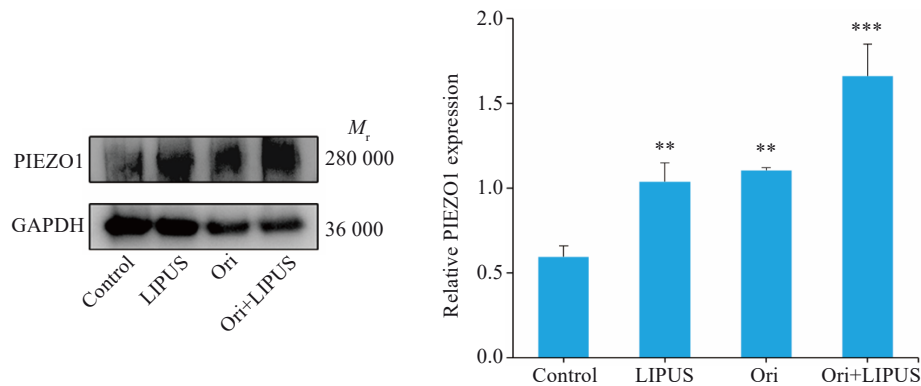


图 15 Ori联合LIPUS处理后PANC-1细胞内PIEZO1蛋白表达

Fig.15 Effect of Ori combined with LIPUS on intracellular PIEZO1 expression ( $n=3$ ). \*\* $P<0.005$  vs Control; \*\*\* $P<0.001$  vs Ori.

针的结果显示, Ori处理显著诱导了PANC-1细胞内脂质过氧化产物的积累。以上结果表明, Ori处理导致PANC-1细胞 $Fe^{2+}$ 积累, 引发氧化应激及脂质过氧化, 并伴随能量代谢障碍和抗氧化能力减弱, 最终导致细胞活力下降。这些变化提示Ori可能通过诱导铁死亡途径抑制PANC-1细胞活力。为验证这一机制, 本实验将PANC-1细胞与Ori及铁死亡特异性抑制剂Fer-1共同孵育24 h后, CCK-8检测结果显示, 与单独使用Ori处理组相比, Ori联合Fer-1组的细胞活力显著升高。该结果证实, Ori对PANC-1细胞增殖的抑制作用主要通过诱导铁死亡实现。

为深入探究Ori诱导铁死亡的具体分子机制, 通过WB检测了经Ori处理的PANC-1细胞中关键蛋白的表达水平, 包括: GPX4、Nrf2以及HO-1。GPX4是细胞内清除脂质过氧化物的关键酶, 其活性依赖于GSH作为辅因子。当细胞内GSH合成减少或耗竭时, GPX4功能受损, 导致脂质过氧化物积累, 进而促进铁死亡的发生<sup>[28]</sup>。HO-1通过催化血红素降解释放 $Fe^{2+}$ , 增加细胞内游离铁池。在铁死亡过程中, HO-1表达上调导致的 $Fe^{2+}$ 积累会通过Fenton反应促进ROS生成和脂质过氧化, 从而进一步驱动铁死亡进程<sup>[29]</sup>。HO-1的表达受Nrf2的直接转录调控。Nrf2是一种关键的氧化还原敏感转录因子。当细胞处于氧化应激状态时, 如ROS水平升高, Nrf2被激活并转位至细胞核, 与靶基因启动子区的抗氧化反应元件(ARE)结合。HO-1基因启动子含有ARE序列, 因此Nrf2的激活能够上调HO-1的表达, 发挥其抗氧化作用<sup>[30]</sup>。既往研究表明, 抗氧化通路Nrf2/HO-1在铁死亡过程中通常表达下调<sup>[31, 32]</sup>。抗氧化通路Nrf2/HO-1在铁死亡过程中通常表达下调。然而本研究中WB结果显示, Ori处理后GPX4蛋白水平下降, 而Nrf2与HO-1表达量却显著升高, 推测铁死亡发生时诱发的氧化应激可能激活了Nrf2/HO-1通路作为代偿性抗氧化反应。但该通路的过度活化会导致HO-1

大量积累, 其降解过程释放的 $Fe^{2+}$ 可进一步加剧铁死亡。综上所述, Ori通过Nrf2/HO-1/GPX4通路诱导PANC-1细胞发生铁死亡。综上所述, 本研究证实Ori通过调控Nrf2/HO-1/GPX4通路诱导PANC-1细胞发生铁死亡。为验证其体内抗肿瘤效果, 采用C57BL/6小鼠, 经皮下注射小鼠胰腺癌细胞panc02建立移植瘤模型。课题组前期研究确定了Ori的有效及安全剂量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。实验终点解剖取材, 结果显示: 与对照组相比, Ori组小鼠肿瘤重量显著减轻。H&E和Ki67染色结果进一步表明, Ori能促进肿瘤组织坏死并抑制其增殖。此外, WB和IF检测显示, Ori组肿瘤组织中GPX4蛋白表达显著降低。以上结果提示, Ori在体内通过促进胰腺癌细胞铁死亡抑制肿瘤增殖。

LIPUS作为一种安全无创的治疗手段, 其疗效主要源于非热效应, 即机械效应与空化效应。具体而言, LIPUS的生物学效应通常起始于细胞膜通道的激活, 进而可调节细胞分化、神经活动以及促进药物递送等过程<sup>[33, 34]</sup>。LIPUS可通过其机械应力增强网格蛋白介导的内吞作用, 从而促进药物跨膜转运<sup>[32, 33]</sup>。其中, PIEZO1机械敏感阳离子通道蛋白主要通过响应机械力变化, 如压力或拉伸, 激活通道允许阳离子流入细胞内。有研究显示PIEZO1受到持续机械应力时激活并诱导 $Fe^{2+}$ 内流<sup>[35-39]</sup>。实验结果显示, LIPUS处理可显著升高细胞内 $Fe^{2+}$ 水平。WB结果表明, 与对照组相比, 单独LIPUS处理组和单独Ori处理组的PIEZO1蛋白表达均显著升高; 且LIPUS+Ori联合处理组的PIEZO1表达升高幅度显著大于Ori单独处理组。此外, 单独应用LIPUS对PANC-1细胞增殖无明显影响; 然而, 当与Ori联合时,  $400\text{ mW}/\text{cm}^2$ 强度的LIPUS能显著增强Ori抑制PANC-1细胞增殖的作用, 该结果与前期研究一致。体内实验表明, 与Ori单独治疗组相比, LIPUS联合Ori治疗对肿瘤生长的抑制作用更为显著。LIPUS单独辐照组小鼠的肿瘤重量和体积与对照组相比无显著差异;

而LIPUS+Ori联合治疗组的肿瘤重量和体积均显著小于Ori单独治疗组。WB及IF染色结果显示,LIPUS单独辐照对肿瘤组织GPX4蛋白表达无明显改变;而LIPUS联合Ori处理后,肿瘤组织内GPX4蛋白表达水平显著低于对照组及Ori单独治疗组。以上结果表明,LIPUS能有效促进Ori抑制胰腺癌增殖的效应。

综上所述,本研究表明中药活性成分Ori对胰腺癌具有显著的治疗效果,能有效抑制肿瘤增殖。其机制与调控Nrf2/HO-1/GPX4通路、升高细胞内Fe<sup>2+</sup>水平,从而诱导铁死亡密切相关。同时,本研究证实LIPUS可通过机械应力激活PIEZO1并诱导Fe<sup>2+</sup>内流,进而与Ori协同促进铁死亡。Ori有效地通过诱导铁死亡的发生来抑制胰腺癌的增殖,为中医药治疗胰腺癌提供了新的思路和理论依据。值得注意的是,LIPUS与当前临床广泛应用的超声诊断及治疗设备原理相通,具备良好的临床转化潜力。LIPUS不仅本身具有诱导铁离子内流的能力,更有望与中药活性成分联用,促进药物在靶组织的富集,降低全身毒性,改善患者预后,为后续临床转化研究奠定了重要的实验基础。下一步研究将深入探索LIPUS促进药物作用的分子机制,并系统评价其对其他抗肿瘤药物的增敏效应。

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

#### 参考文献:

- [1] 易丽夏,方涵露,李婧怡,等. 2022年全球和中国胰腺癌发病及死亡分析[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45(12): 1470-7.
- [2] Zheng RS, Zhang SW, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9.
- [3] Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca di Magliano M, et al. Pancreatic cancer: advances and challenges[J]. Cell, 2023, 186(8): 1729-54.
- [4] 中国抗癌协会胰腺癌专业委员会,虞先濬,徐近. 中国抗癌协会胰腺癌整合诊治指南(精简版)[J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50(10): 487-96.
- [5] Rohatgi S, Jagannathan JP, Rosenthal MH, et al. Vascular toxicity associated with chemotherapy and molecular targeted therapy: what should a radiologist know[J]? AJR Am J Roentgenol, 2014, 203(6): 1353-62.
- [6] 韦天夫,周琪,胡凤林,等. 慢性胰腺炎癌转化中医理论浅析[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1192-4.
- [7] 魏小曼,李柳,王俊壹,等. 癌毒病机理论辨治胰腺癌探讨[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 2062-5.
- [8] 刘延泽,陈士林,马培,等. 中草药中发现新抗癌药物的途径[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(4): 323-37.
- [9] 高世勇,唐博琪,魏新瑞,等. 冬凌草的本草考证、化学成分、药理作用及其临床应用[J]. 中草药, 2023, 54(19): 6543-54.
- [10] Li X, Zhang CT, Ma W, et al. Oridonin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 645824.
- [11] Zhang CL, Wu LJ, Zuo HJ, et al. Cytochrome c release from oridonin-treated apoptotic A375-S2 cells is dependent on p53 and extracellular signal-regulated kinase activation[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 96(2): 155-63.
- [12] Huang J, Wu LJ, Tashiro SI, et al. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107(4): 370-9.
- [13] Liu Y, Song Z, Liu YJ, et al. Identification of ferroptosis as a novel mechanism for antitumor activity of natural product derivative a2 in gastric cancer[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1513-25.
- [14] Ye SY, Hu XY, Sun SW, et al. Oridonin promotes RSL3-induced ferroptosis in breast cancer cells by regulating the oxidative stress signaling pathway JNK/Nrf2/HO-1[J]. Eur J Pharmacol, 2024, 974: 176620.
- [15] Cai MR, Fu TT, Zhu RY, et al. An iron-based metal-organic framework nanoplatfor for enhanced ferroptosis and oridonin delivery as a comprehensive antitumor strategy[J]. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(9): 4073-86.
- [16] 倪琰,郭晓冬,王静霞,等. 胰腺癌中医治疗评述[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(12): 2117-22.
- [17] Yang X, Liu YQ, Wang Z, et al. Ferroptosis as a new tool for tumor suppression through lipid peroxidation[J]. Commun Biol, 2024, 7(1): 1475.
- [18] De Leon-Oliva D, Boaru DL, Minaya-Bravo AM, et al. Improving understanding of ferroptosis: Molecular mechanisms, connection with cellular senescence and implications for aging[J]. Heliyon, 2024, 10(21): e39684.
- [19] Chen AQ, Huang HF, Fang SM, et al. ROS: a "booster" for chronic inflammation and tumor metastasis[J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 2024, 1879(6): 189175.
- [20] Su ZY, Liu YQ, Wang L, et al. Regulation of SLC7A11 as an unconventional checkpoint in tumorigenesis through ferroptosis[J]. Genes Dis, 2024, 12(1): 101254.
- [21] Zhu LP, Leng DL, Guo ZA, et al. Self-catalyzed nitric oxide nano complexes induce ferroptosis for cancer immunotherapy[J]. J Control Release, 2025, 377: 524-39.
- [22] 李泽彦,李国东,孙硕,等. 雷公藤红素诱导人胰腺癌PANC-1细胞铁死亡的机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(6): 1062-9.
- [23] Liu X, Xu JM, Zhou J, et al. Oridonin and its derivatives for cancer treatment and overcoming therapeutic resistance[J]. Genes Dis, 2020, 8(4): 448-62.
- [24] Nomikou N, Li YS, McHale AP. Ultrasound-enhanced drug dispersion through solid tumours and its possible role in aiding ultrasound-targeted cancer chemotherapy[J]. Cancer Lett, 2010, 288(1): 94-8.
- [25] Gong YP, Wang ZG, Dong GF, et al. Low-intensity focused ultrasound mediated localized drug delivery for liver tumors in rabbits[J]. Drug Deliv, 2016, 23(7): 2280-9.
- [26] 孙亚超,王昊,商慧娟,等. 低强度脉冲超声研究现状及趋势的可视化分析[J]. 联勤军事医学, 2024, 38(1): 75-84.
- [27] 王敏丹,刘莉,崔夏莲,等. 冬凌草甲素对食管鳞状细胞癌细胞内谷胱甘肽代谢网络影响的研究[J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(7): 77-82, 94.
- [28] Ru Q, Li YS, Chen L, et al. Iron homeostasis and ferroptosis in human diseases: mechanisms and therapeutic prospects[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 271.

- [29] Kwon MY, Park E, Lee SJ, et al. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 24393-403.
- [30] O' Rourke SA, Shanley LC, Dunne A. The Nrf2-HO-1 system and inflammaging[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1457010.
- [31] Zhu YT, Zhang JC, Liu QN, et al. Semen *Cuscutae-Fructus Lycii* attenuates *Tripterygium glycosides*-induced spermatogenesis dysfunction by inhibiting oxidative stress-mediated ferroptosis *via* the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156221.
- [32] Du HF, Wu JW, Zhu YS, et al. Fucoxanthin induces ferroptosis in cancer cells *via* downregulation of the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway [J]. *Molecules*, 2024, 29(12): 2832.
- [33] Acheta J, Stephens SBZ, Belin S, et al. Therapeutic low-intensity ultrasound for peripheral nerve regeneration - a schwann cell perspective[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 15: 812588.
- [34] Xu MS, Wang L, Wu SM, et al. Review on experimental study and clinical application of low-intensity pulsed ultrasound in inflammation[J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2021, 11(1): 443-62.
- [35] Tardoski S, Gineyts E, Ngo J, et al. Low-intensity ultrasound promotes clathrin-dependent endocytosis for drug penetration into tumor cells[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2015, 41(10): 2740-54.
- [36] Lentacker I, De Cock I, Deckers R, et al. Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 72: 49-64.
- [37] Jin JQ, Fan ZF, Long YL, et al. Matrine induces ferroptosis in cervical cancer through activation of piezo1 channel[J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155165.
- [38] Wang SY, Li WW, Zhang PF, et al. Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis *via* Piezo1 channel facilitated calcium influx [J]. *J Adv Res*, 2022, 41: 63-75.
- [39] Xiang ZQ, Zhang PF, Jia CW, et al. Piezo1 channel exaggerates ferroptosis of nucleus pulposus cells by mediating mechanical stress-induced iron influx [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 20.

(编辑:吴锦雅)