

藏红花素通过 IRF7/NF- κ B 信号通路对垂体腺瘤的抑制作用

刘卓慧, 覃诗茵, 赵鹤翔, 贾峰峰, 阮 标, 龙瑞清
(昆明医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 云南 昆明 650032)

[摘要] 目的 通过临床样本及垂体腺瘤 HP75 细胞的相关分子生物学实验探讨藏红花素(Crocic)在垂体腺瘤(PA)中的作用及其机制。方法 收集 2022 年 6 月至 2023 年 5 月昆明医科大学第一附属医院神经外科及耳鼻咽喉颅底外科 16 例 PA 样本, 3 例正常对照垂体组织样本来自于昆明医科大学法医学院人体解剖。通过对临床样本检测 IRF7 mRNA 表达量, 敲低 HP75 细胞 IRF7 表达检测增殖、迁移、侵袭及凋亡能力; 进一步检测 HP75 细胞中 IRF7 调控 NF- κ B 表达, 以及藏红花素调控 PA 细胞的生长及其对 IRF7/NF- κ B 信号通路调控作用。结果 RT-qPCR 检测及免疫组化显示, 与正常对照组相比, PA 中 IRF7 mRNA 的表达量增加($P < 0.001$); si-IRF7 组的 IRF7 蛋白表达量降低($P < 0.001$); CCK-8、Transwell 及流式细胞术检测结果显示, 与对照组相比, 敲低 IRF7 降低 HP75 细胞的细胞活力($P < 0.001$), 抑制 HP75 细胞的迁移和侵袭($P < 0.001$), 促进 HP75 细胞凋亡($P < 0.001$)。此外, 敲低 IRF7 能抑制 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的表达($P < 0.001$), 抑制 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的表达($P < 0.001$); 而过表达 IRF7 能部分逆转 Crocic 的作用($P < 0.001$), p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的表达($P < 0.01$); 最后, HP75 细胞的生物学行为检测结果显示, 与 Crocic 组相比, 过表达 IRF7 能提高 HP75 细胞的细胞活力, 同时促进其迁移和侵袭, 抑制细胞凋亡($P < 0.001$)。结论 Crocic 处理能抑制 PA 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡, 缓解 PA 的发展进程。在机制上, IRF7 在 PA 中高表达, 敲低 IRF7 能抑制 PA 的恶性生长; Crocic 抑制 PA 细胞增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡的作用可通过抑制 IRF7/NF- κ B 信号通路实现。

[关键词] 垂体腺瘤; 藏红花素; IRF7/NF- κ B 信号通路; 迁移; 侵袭; 细胞凋亡

[中图分类号] R736.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)12-0019-09

Inhibitory Effect of Crocin on Pituitary Adenomas via IRF7/NF- κ B Signaling Pathway

LIU Zhuohui, QIN Shiyin, ZHAO Hexiang, JIA Fengfeng, RUAN Biao, LONG Ruiqing
(Dept. of Otolaryngology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role and mechanism of crocin in pituitary adenoma (PA) through clinical samples and related molecular biology experiments of HP75 cells. **Methods** From June 2022 to May 2023, 16 PA samples were collected from the Second Department of Neurology and Otolaryngology skull base surgery of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University. Three normal control samples were from the human anatomy of the Forensic College of Kunming Medical University. The expression of IRF7 mRNA in clinical samples was detected, and the proliferation, migration, invasion and apoptosis of HP75 cells were detected by knocking down the expression of IRF7; the expression of NF- κ B was regulated by IRF7 in HP75 cells, and crocin regulated the growth of PA cells and its regulatory effect on IRF7/NF- κ B signaling pathway. **Results** RT-qPCR and immunohisto-chemistry showed that compared with the normal control group, the expression of IRF7 mRNA in PA

[收稿日期] 2024-08-26

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金资助项目(82160513); 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项(202101AY070001-082); 云南省建设面向南亚东南亚科技创新中心专项(202303AP140005)

[作者简介] 刘卓慧(1985~), 女, 云南昆明人, 医学博士, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉科基础及临床研究工作。

[通信作者] 龙瑞清, E-mail: lrq323638@163.com

was significantly increased ($P < 0.001$); the expression of IRF7 protein in si-IRF7 group was significantly decreased ($P < 0.001$); CCK-8, Transwell and flow cytometry results showed that compared with the control group, knockdown of IRF7 significantly decreased the cell viability of HP75 cells ($P < 0.001$), inhibited the migration and invasion ($P < 0.001$), and promoted the apoptosis of HP75 cells ($P < 0.001$). In addition, knockdown of IRF7 could inhibit the expression of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ($P < 0.001$) and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ($P < 0.001$). Overexpression of IRF7 partially reversed the effect of crocin ($P < 0.001$) and restored the expression of p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 ($P < 0.01$). Finally, the biological behavior of HP75 cells showed that compared with crocin group, overexpression of IRF7 could improve the cell viability of HP75 cells, promote their migration and invasion, and inhibit cell apoptosis ($P < 0.001$). **Conclusion** Crocin treatment can inhibit the proliferation, migration and invasion of PA cells, promote cell apoptosis, and alleviate the development of PA. In the mechanism, IRF7 is significantly overexpressed in PA, and knockdown of IRF7 can inhibit the malignant growth of PA. Crocin can inhibit the proliferation, migration and invasion of PA cells, and promote apoptosis by inhibiting IRF7/NF- κ B signaling pathway.

[**Key words**] Pituitary adenoma; Crocetin; IRF7/NF- κ B signaling pathway; Migration; Invasion; Apoptosis

垂体腺瘤(pituitary adenoma, PA)是起源于垂体前叶的良性肿瘤,根据临床病例研究,其发病率为 0.037%~0.116%,约占所有颅内肿瘤的 10%^[1-2]。PA 常发生在年轻人身上,表现为一系列内分泌症状,包括肢端生长和性功能下降。PA 虽然是良性肿瘤,但会出现浸润性生长,这是恶性肿瘤的生物学行为之一^[3]。它经常侵入邻近组织,包括血管壁、海绵窦甚至脑组织,引起各种并发症。PA 的这种侵袭性生长与肿瘤的复发和预后密切相关^[4]。目前,PA 的治疗方法仍然有限,因此迫切需要找到能够有效治疗 PA 的新策略。

藏红花素(crocetin)是藏红花的主要成分之一,它是一种可溶性类胡萝卜素,具有两个 D-龙胆二糖苷(D-gentiobioside)糖基酯。藏红花苷的作用机制非常复杂^[5],包括抑制 DNA 和 RNA 合成、逆转上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、抑制细胞侵袭和转移、靶向细胞拓扑异构酶和微管、诱导细胞凋亡、抑制端粒酶活性、减少氧化应激和表观遗传效应。这些机制表明, Crocin 可能具有抗肿瘤的潜力。并且已有研究证实, Crocin 对肺癌^[6]、胃腺癌^[7]、皮肤癌^[8]和乳腺癌^[9]等具有抗增殖和促凋亡作用。但 Crocin 是否对 PA 具有治疗作用目前还不清楚。

干扰素调节因子(interferon regulatory factors, IRFs)属于转录因子家族,在免疫调节、细胞周期调节、细胞分化和细胞凋亡中发挥着重要作用^[10-11]。新的研究揭示了 IRF 家族成员在肿瘤生物学中的多种作用,包括但不限于肿瘤生长、细胞侵袭、血管生成和化疗抗药性等^[12-14]。已有研究证明, IRF7 可能与 PA 的发生和发展有关^[15]。而核因子

激活的 B 细胞的 κ -轻链增强因子(NF- κ -light chain enhancer of B cells activated by nuclear factors, NF- κ B)作为一种核转录因子,不仅能促进 PA 的增殖、侵袭、迁移和 EMT^[16],还受到 IRF7 的调控^[17]。重要的是, Crocin 还能通过抑制 NF- κ B 的活化来抑制乳腺癌细胞的炎症和增殖^[18]。因此,探讨 IRF7/NF- κ B 信号通路在 PA 中的作用,可能为 PA 的治疗提供新的靶点。

在本研究中,笔者深入探讨了 IRF7/NF- κ B 信号通路 Crocin 在 PA 中的作用机制,试图为 PA 的治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 样本收集

从昆明医科大学第一附属医院收集了 2022 年 6 月至 2023 年 5 月来自于神经外二科及耳鼻咽喉颅底外科 16 例 PA 样本,3 例正常对照垂体系本来自于昆明医科大学法医学院人体解剖。然后将新鲜组织分成 2 份,1 份在液氮中速冻并保持于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,另 1 份在 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后进项石蜡包埋,样本在进行后续研究。在进行相关实验之前,已获得所有个体参与者的知情同意及昆明医科大学第一附属医院伦理审批 [(2022) 伦审 L 第 268 号]。

1.2 细胞培养与转染

人垂体腺瘤细胞 HP75 从上海细胞库获得,并培养于含 10% 胎牛血清(Gibco, USA)、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素(Sigma, USA)的 DMEM 培养基(Hyclone, USA)中,放于细胞培养箱中,

37 °C、5% CO₂ 常规培养。将培养好的 HP75 细胞用 0、2、4、6、8、10 mg/mL 的 Crocin (Sigma-Aldrich, USA) 处理 24 h, 用 CCK8 检测方法检测 Crocin 的作用及最佳抑制浓度。

将 HP75 细胞在 24 孔板中培养过夜, 待细胞密度达到 60 ~ 70% 左右时, 根据 Lipofectamine 3000 试剂 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 说明书将 si-IRF7、OE-IRF7 以及相关阴性对照转染至 HP75 细胞中, 并于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h, 并检测转染效率。

1.3 免疫组化

石蜡包埋的瘤体组织进行脱蜡和再水化, 然后在 0.01 M 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中进行抗原修复。用抗体 IRF7 (1 : 200, MA5-41165, Thermo Fisher Scientific, USA) 在 4 °C 下孵育过夜, 并使用 HRP 二抗和 DAB 显色剂进行免疫检测。使用荧光显微镜 (NiKon, Japan) 进行拍照观察。

1.4 RT-qPCR

使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 15596026) 提取临床组织样本中的总 RNA, 采用 First-Strand cDNA 合成试剂盒 (Genenode, China) 将 RNA 逆转录合成 cDNA, 使用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Solarbio, China) 进行实时荧光定量 PCR。以 β -actin 为内参, 结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算。引物序列的详细信息显示见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequence

靶基因	序列 (F: 正向引物; R: 反向引物) (5'-3')
IRF7	F: GCTGGACGTGACCATCATGTA
	R: GGGCCGTATAGGAACGTGC
β -actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.5 Western blot 检测

使用含有蛋白磷酸酶抑制剂 (1 \times ; Solarbio, China) 的细胞裂解缓冲液 (Beyotime, China) 从处理过的 HP75 细胞中分离总蛋白。裂解和离心后收集蛋白质。使用 NanoDrop™ 2000/2000c 光谱仪 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) 测量蛋白质浓度。与 5 \times Loading Buffer (Beyotime, China) 混合后, 100 °C 水煮 10 min, 然后 -80 °C 保存。蛋白质样品 (100 μ g) 经 SDS-PAGE 分离后转移到聚偏二氟乙烯膜 (Millipore, Billerica, MA) 上。温下用 5% 牛奶封闭 1 h 后, 用一抗在 4 °C 孵育过夜。第 2 天, 将膜与二抗 (1 : 4000, ab97051,

Abcam, UK) 在室温下孵育 1 h。图像由 FluorChem E (ProteinSimple, San Jose, CA) 检测, 并由 ImageJ 软件分析。

一抗使用浓度如下: IRF7 (1 : 2000, MA5-41165, Thermo Fisher Scientific, USA)、p-IRF7 (1 : 1000, PA5-114592, Thermo Fisher Scientific, USA)、NF- κ B p65 (1 : 1000, ab16502, Abcam, UK)、p-NF- κ B p65 (1 : 1000, ab86299, Abcam, UK)、Histone H3 (1 : 1000, ab1791, Abcam, UK)、 β -actin (1 : 3000, ab8226, Abcam, UK)。

1.6 CCK-8

将 HP75 细胞 (5 \times 10³ 细胞/孔) 接种在 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 按分组处理各组细胞, 处理结束后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂 (C0037, Beyotime, China), 然后再孵育 2 h。使用酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 在 450 nm 处测量每个孔的吸光度值。

1.7 Transwell

细胞侵袭和迁移实验在 Transwell 小室 (Corning, USA) 中进行, 各组 HP75 细胞用无血清 DMEM 培养基调整浓度为 1 \times 10⁵ 个/mL。200 μ L 细胞悬液加入涂或不涂 Matrigel 的 Transwell 小室上室。在 24 孔板下室中加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养 24 h 后下室细胞用 4% 多聚甲醛固定, 并用结晶紫染色 (Solarbio, China), 于倒置显微镜下 (CKX53, OLYMPUS, Japan) 观察每 1 个孔内固定位置的细胞数量, 并选取 3 个视野进行计数拍照。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

收集按分组处理后的 HP75 细胞并用胰蛋白酶消化, PBS 洗涤 2 次, 200 μ L PBS 重悬。采用 Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (Absin, China) 检测其凋亡率。根据制造商的说明书, 每孔加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 暗室孵育 15 min, 然后使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.9 免疫荧光检测

处理好的 HP75 细胞用 PBS 洗涤两次, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 0.5% Triton X-100 透化 10 min, 用牛血清白蛋白封闭 1 h。随后, 细胞与一抗 NF- κ B (1 : 200, ab16502, Abcam, UK) 在 4 °C 孵育过夜。次日, 与相应的二抗孵育 1 h, DAPI 染色。最后, 染色的细胞在荧光显微镜 (NiKon, Japan) 下观察并拍摄图像。

1.10 统计学处理

使用 GraphPad Prism version 8 软件 (Graph-

Pad, USA)分析数据并作图。数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所有实验至少重复3次。统计学分析采用 *t* 检验(Student's *t* test)评估2组数据之间的差异;采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或双因素方差分析(Two-way ANOVA)评估多组数据之间的差异,并用 Fishers LSD 或者 Tukey 事后检验进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IRF7 在垂体腺瘤中高表达

首先,检测了 IRF7 在 16 例 PA 临床样本中的表达情况。RT-qPCR 检测结果显示,与 3 例正常对照组相比,PA 中 IRF7 mRNA 的表达量增加($P < 0.001$),见图 1A。免疫组化检测结果同样表明,IRF7 在 PA 中表达上调($P < 0.001$),见图 1B。以上结果表明,IRF7 在 PA 中高表达。

2.2 敲低 IRF7 抑制垂体腺瘤细胞增殖、迁移、侵袭,促进凋亡

为了检测 IRF7 对 PA 细胞恶性生物学行为的影响,笔者在 HP75 细胞中敲低 IRF7,并且 si-IRF7 组的 IRF7 蛋白表达量降低($P < 0.001$),见图 2A。CCK-8 检测结果显示,与对照组相比,敲低 IRF7 降低 HP75 细胞的细胞活力($P < 0.001$),见图 2B。Transwell 检测结果显示,与对照组相比,敲低 IRF7 抑制 HP75 细胞的迁移和侵袭($P < 0.001$),见图 2C。最后,流式细胞术检测结果显示,敲低 IRF7 促进 HP75 细胞凋亡($P < 0.001$),见图 2D。以上结果表明,敲低 IRF7 能抑制 HP75 细胞的增殖、迁移和侵袭,促进凋亡。

2.3 敲低 IRF7 抑制 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 不仅能促进 PA 的发生和发展,还受到 IRF7 的调控。因此,检测了在 HP75 细胞中 IRF7

能否调控 NF- κ B 的表达。Western blot 检测结果显示,敲低 IRF7 能抑制 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的表达($P < 0.01$),见图 3A。免疫荧光检测结果同样表明,敲低 IRF7 能抑制 NF- κ B p65 的表达($P < 0.01$),见图 3B。以上结果表明,敲低 IRF7 能抑制 NF- κ B 信号通路。

2.4 藏红花素抑制垂体腺瘤细胞生长,且调控 IRF7/NF- κ B 信号通路

紧接着检测了 Crocin 能否调控 PA 细胞的生长,首先用不同浓度的 Crocin(0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml)处理 HP75 细胞 24 h,发现 HP75 细胞的细胞活力随着 Crocin 浓度的增加而降低,并且 6 mg/mL 的细胞活力低于 50%,因此后续选取的 6 mg/mL 的 Crocin 处理 HP75 细胞($P < 0.001$),见图 4A。HP75 细胞的生物学行为检测结果显示,与对照组相比,加入 Crocin 能降低 HP75 细胞的细胞活力,同时抑制其迁移和侵袭,促进细胞凋亡($P < 0.001$),见图 4B-D。另外,Western blot 检测结果显示,Crocin 处理能抑制 IRF7 的磷酸化以及 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的表达($P < 0.001$),见图 4E。并且,Crocin 处理还能抑制 IRF7 的核转移($P < 0.001$),见图 4F。以上结果表明,Crocin 不仅能抑制 HP75 细胞的恶性生物学行为,还能抑制 IRF7/NF- κ B 信号通路。

2.5 藏红花素通过 IRF7 抑制垂体腺瘤细胞生长

最后,为了验证 Crocin 是否通过 IRF7/NF- κ B 信号通路调控 PA 细胞的恶性生长,笔者在 HP75 细胞过表达 IRF7($P < 0.001$),见图 5A,并且过表达 IRF7 能部分逆转 Crocin 的作用,回复 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 的表达($P < 0.01$),见图 5B。HP75 细胞的生物学行为检测结果显示,与 Crocin 组相比,过表达 IRF7 能部分逆转 Crocin 的作用,提高 HP75 细胞的细胞活力($P < 0.001$),

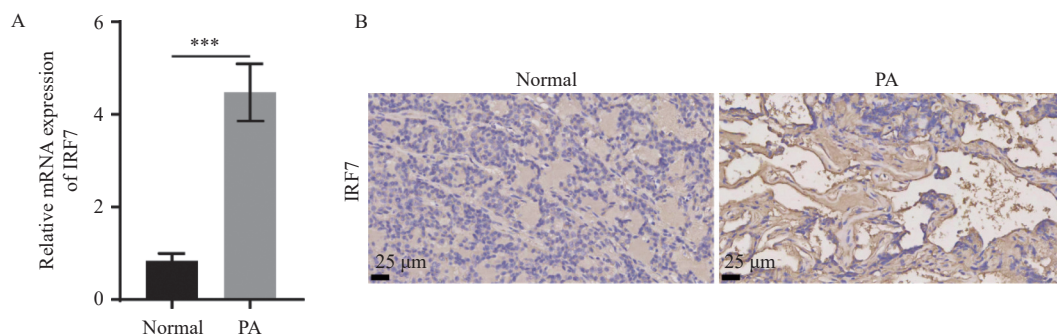


图 1 IRF7 在垂体腺瘤中高表达

Fig. 1 High expression of IRF7 was observed in pituitary adenomas

A: RT-qPCR 检测 16 例 PA 临床样本中 IRF7 mRNA 的表达情况($\bar{x}\pm s$); B: 免疫组化检测临床样本中 IRF7 的表达情况(DAB 染色, 200 \times)。*** $P < 0.001$ 。

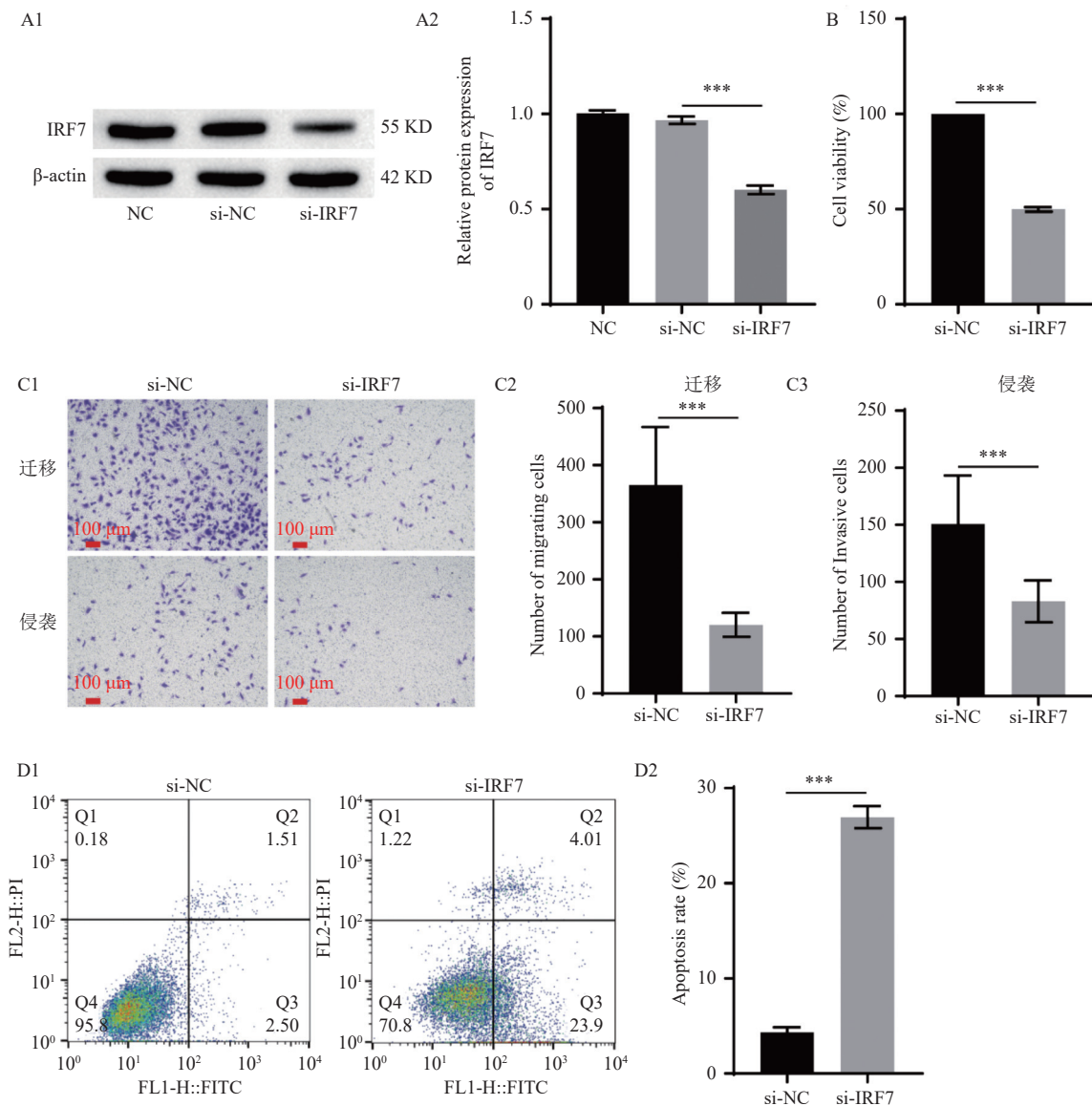


图 2 敲低 IRF7 抑制垂体腺瘤细胞增殖、迁移、侵袭，促进凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Knocking down IRF7 inhibited the proliferation, migration, and invasion of pituitary adenoma cells and promoted apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A: Western blot 检测 IRF7 的转染效率 (A1: Western blot 检测 IRF7 的蛋白表达电泳图, A2: IRF7 蛋白表达的统计学分析); B: CCK-8 检测 HP75 细胞的细胞活力; C: Transwell 检测 HP75 细胞迁移和侵袭 (100 \times) (C1: Transwell 检测 HP75 细胞迁移和侵袭, C2: HP75 细胞迁移统计学分析, C3: HP75 细胞侵袭统计学分析); D: 流式细胞术检测 HP75 细胞凋亡 (D1: 流式细胞术检测 HP75 细胞凋亡, D2: HP75 细胞凋亡统计学分析)。*** $P < 0.001$ 。

同时促进其迁移和侵袭 ($P < 0.01$), 抑制细胞凋亡 ($P < 0.01$), 见图 5C ~ E。以上结果表明, Crocin 能通过抑制 IRF7/NF- κ B 信号通路来抑制 PA 细胞的生长。

3 讨论

3.1 Crocin 对 PA 细胞的作用

PA 主要起源于垂体前叶, 是仅次于胶质瘤和脑膜瘤的第三常见的脑肿瘤^[19]。由于其生长位置

特殊, 治疗难度很大。到目前为止, 该病的发病机制还不是很清楚^[20-21], 对其致病基因也没有明确统一的结论。临床上, 侵袭性 PA 很难完全切除, 治疗效果差, 复发率高, 是 PA 治疗中的主要问题^[22-23]。目前, PA 的治疗主要依靠手术、放疗和化疗, 缺乏药物治疗。本研究旨在探讨 Crocin 通过调控 IRF7/NF- κ B 信号通路在 PA 生长中的作用。

近年来, 中药治疗各种肿瘤以其毒性小、副作用少等优势成为肿瘤学领域的热点和焦点。从

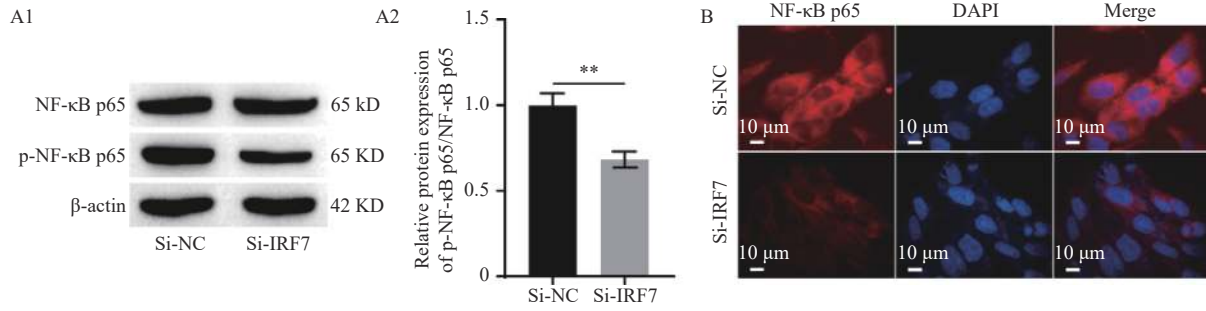


图 3 敲低 IRF7 抑制 NF-κB 信号通路 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Knocking down IRF7 inhibited the NF-κB signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Western blot 检测 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 的表达(A1: Western blot 检测 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 的蛋白表达电泳图, A2: NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达的统计学分析); B: 免疫荧光检测 NF-κB p65 的表达(1000×)。** $P < 0.01$ 。

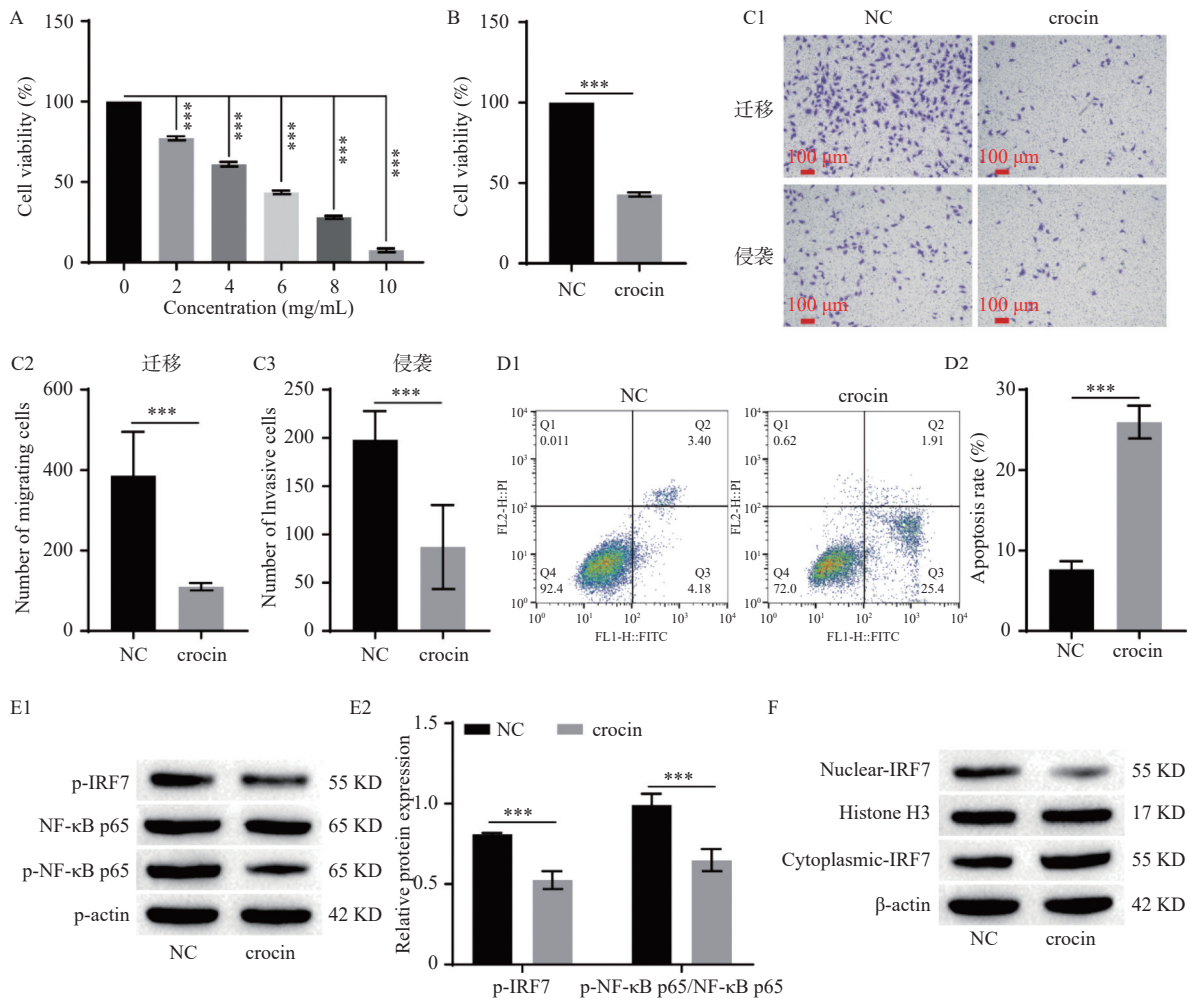


图 4 藏红花素抑制垂体腺瘤细胞恶性生长, 且调控 IRF7/NF-κB 信号通路 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Crocin inhibited the malignant growth of pituitary adenoma cells and regulated the IRF7/NF-κB signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Crocin 浓度梯度处理后 CCK-8 检测 HP75 细胞的细胞活力; B: CCK-8 检测 HP75 细胞的细胞活力; C: Transwell 检测 HP75 细胞迁移和侵袭(100×)(C1: Transwell 检测 HP75 细胞迁移和侵袭, C2: HP75 细胞迁移统计学分析, C3: HP75 细胞侵袭统计学分析); D: 流式细胞术检测 HP75 细胞凋亡(D1: 流式细胞术检测 HP75 细胞凋亡, D2: HP75 细胞凋亡统计学分析); E: Western blot 检测 IRF7/NF-κB 信号通路相关蛋白的表达水平(E1: Western blot 检测 IRF7/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的电泳图, E2: IRF7/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的统计学分析); F: Western blot 检测 IRF7 的核转移。*** $P < 0.001$ 。

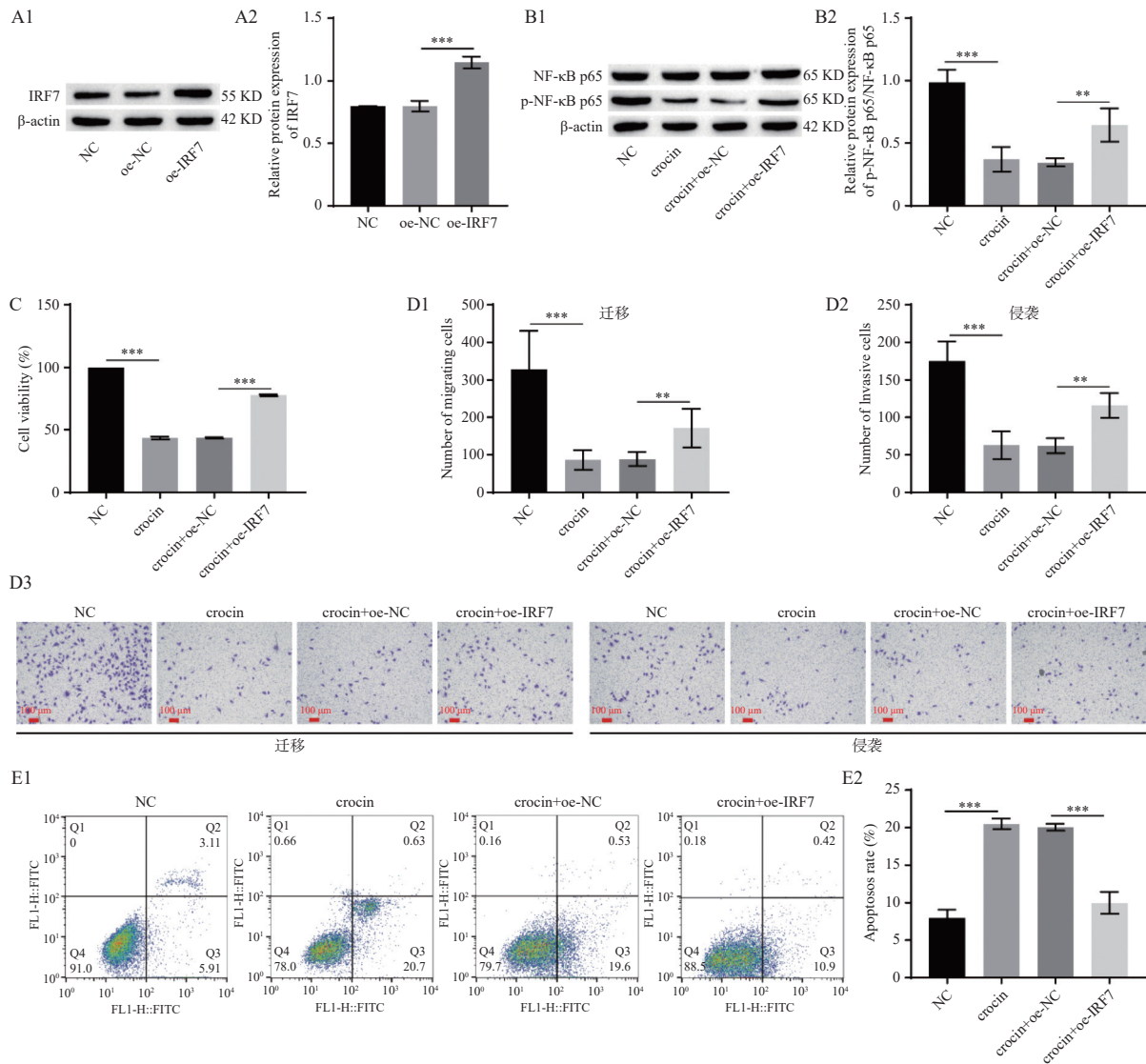


图 5 藏红花素抑制垂体腺瘤细胞恶性生长, 调控 IRF7/NF- κ B 信号通路($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Crocin inhibited the malignant growth of pituitary adenoma cells and regulated the IRF7/NF- κ B signaling pathway($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A: Western blot 检测 IRF7 的过表达效率(A1: Western blot 检测 IRF7 蛋白表达的电泳图, A2: IRF7 蛋白表达的统计学分析); B: Western blot 检测 NF- κ B p65 和 p-NF- κ B p65 的表达(B1: Western blot 检测 NF- κ B p65 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达的电泳图, B2: NF- κ B p65 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达的统计学分析); C: CCK-8 检测 HP75 细胞的细胞活力; D: Transwell 检测 HP75 细胞迁移和侵袭(100 \times)(D1: HP75 细胞迁移统计学分析, D2: HP75 细胞侵袭统计学分析, D3: Transwell 检测 HP75 细胞迁移和侵袭); E: 流式细胞术检测 HP75 细胞凋亡(E1: 流式细胞术检测 HP75 细胞凋亡, E2: HP75 细胞凋亡统计学分析)。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

藏红花中提取的 Crocin 具有多种药理作用, 如抗氧化、抗炎和抗抑郁作用^[5]。此外, Crocin 对不同类型癌细胞的细胞毒性也已得到证实^[24]。如 Bakshi^[25] 等研究表明, Crocin 能通过靶向 NF- κ B 和阻断 TNF- α /NF- κ B/VEGF 通路, 抑制血管生成和结直肠癌细胞转移。Bi 等^[26] 研究发现, Crocin 能通过调控 miR-320a/ATG2B 信号通路来抑制皮肤鳞状细胞癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。本研究发现 Crocin 能抑制 PA 细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进其细胞凋亡。笔者团队的研究首

次证明了 Crocin 具有抑制 PA 细胞恶性生长的作用。

3.2 Crocin 通过 IRF7/NF- κ B 信号通路调控 PA 进展

虽然已经确定了 Crocin 的保护作用, 但潜在的分子作用机制尚不清楚。IRF7 作为一种多功能转录因子, 除了参与免疫调节外, 还能调节细胞分化、增殖和凋亡。因此, IRF7 在肿瘤发生和转移中发挥着重要作用^[27]。2024 年, Lv 等^[28] 研究表明, 通过减少 IRF7 的类泛素化, 可以抑制乳

腺癌症的进展。更有趣的是, IRF7 还可以作为促进癌症发展的致癌基因。Lin^[29] 等研究发现, Circ-EGLN3 能通过竞争性结合 miR-1299 来增强 IRF7 的表达, 进而促进肾细胞癌细胞的增殖和侵袭。因此, 笔者团队首先探究了 IRF7 在 PA 中的表达情况, 发现 IRF7 在 PA 中高表达。并且敲低 IRF7 能抑制 PA 细胞的增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡。表明 IRF7 在 PA 中发挥着致癌因子的作用。

此外, 还有研究表明, IRF7 和 NF- κ B 是病毒感染过程中激活的两种主要转录因子, 并且 IRF7 能调控 NF- κ B 的表达^[17]。2021 年, Teng^[30] 等研究发现, Crocin 还能通过抑制 NF- κ B 介导的炎症, Crocin 通过调节核因子- κ B(NF- κ B) 信号通路, 调节白细胞介素等多种细胞因子的活性, 从而发挥抗炎作用, 并能显著抑制 ApcMinC/Gpt 小鼠肿瘤生长, 改善结肠的病理改变, 降低血清和结肠组织中白细胞介素和肿瘤坏死因子- α 的浓度, 从而可用来预防溃疡性结肠炎和结肠直肠癌。在本研究中, 笔者还发现 IRF7 具有激活 NF- κ B 信号通路的作用。而且 Crocin 处理能抑制 IRF7 和 NF- κ B 的磷酸化, 以及 IRF7 的核转移。过表达 IRF7 则能削弱 Crocin 对 PA 细胞恶性生长的作用。综上所述, 笔者团队在前人的研究基础上揭示了, Crocin 通过 IRF7/NF- κ B 信号通路调控 PA 发展进程的新机制。

总之, 笔者团队的研究结果表明, Crocin 通过抑制 IRF7/NF- κ B 信号通路来抑制 PA 细胞的增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡, 缓解 PA 的发展进程。但本研究存在一定的局限性, 首先, Crocin 作为 1 种多功能药物, 考虑到分子机制的多样性, 未来还需从多角度探讨 Crocin 缓解 PA 的机制, 如焦亡和血管生成等。此外, Crocin 对正常垂体细胞的影响及其对正常垂体细胞有效安全剂量范围仍需实验探讨。最后, 笔者团队只通过细胞实验发现该现象, 缺乏动物和临床试验; 因此, 要将 Crocin 应用到 PA 的治疗中, 未来还有待进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Tritos NA, Miller KK. Diagnosis and management of pituitary adenomas: A review[J]. JAMA, 2023, 329(16): 1386-1398.
- [2] Hlaváčková M, Sommer F, Karpel-massler G, et al. Differential diagnosis and treatment of pituitary adenomas[J]. HNO, 2019, 67(4): 307-318.
- [3] Jin L, Cai K, Wu W, et al. Correlations between the expression of molecules in the TGF- β signaling pathway and clinical factors in adamantinomatous craniopharyngiomas[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14(3): e1167776.
- [4] Beylerli O, Gareev I, Pavlov V, et al. The role of long non-coding RNAs in the biology of pituitary adenomas[J]. World Neurosurg, 2020, 137(5): 252-256.
- [5] Bukhari SI, Manzoor M, Dhar M K. A comprehensive review of the pharmacological potential of Crocus sativus and its bioactive apocarotenoids[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98(2): 733-745.
- [6] Luo Y, Yu P, Zhao J, et al. Pathogenesis and anti-proliferation mechanisms of Crocin in human gastric carcinoma cells[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2020, 13(5): 912-922.
- [7] Faraji S, Moosavi SA, Neshasteh-riz A, et al. Radioprotective effect of resveratrol, crocin, and their combination on cytogenetic alterations in human lymphocytes[J]. J Biomed Phys Eng, 2024, 14(3): 255-266.
- [8] Wang G, Zhang B, Wang Y, et al. Crocin promotes apoptosis of human skin cancer cells by inhibiting the JAK/STAT pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2018, 16(6): 5079-5084.
- [9] Jia Y, Yang H, Yu J, et al. Crocin suppresses breast cancer cell proliferation by down-regulating tumor promoter miR-122-5p and up-regulating tumor suppressors FOXP2 and SPRY2[J]. Environmental toxicology, 2023, 38(7): 1597-1608.
- [10] Xiao Q, Li X, Li Y, et al. Biological drug and drug delivery-mediated immunotherapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(4): 941-960.
- [11] Antonczyk A, Krist B, Sajek M, et al. Direct Inhibition of IRF-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10(5): e01176.
- [12] Li W, Wang Q, Feng Q, et al. Oncogenic KSHV-encoded interferon regulatory factor upregulates HMGB2 and CMPK1 expression to promote cell invasion by disrupting a complex lncRNA-OIP5-AS1/miR-218-5p network[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(1): e1007578.
- [13] Li W, Wang F, Shi J, et al. Sperm associated antigen 9 promotes oncogenic KSHV-encoded interferon regulatory

- factor-induced cellular transformation and angiogenesis by activating the JNK/VEGFA pathway[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(8): e1008730.
- [14] Liao W, Overman M J, Boutin A T, et al. KRAS-IRF2 axis drives immune suppression and immune therapy resistance in colorectal cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(4): 559-572.
- [15] Kazzaz S A, Tawil J, Harhaj E W. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in cancer and immunity: Beyond a chaperone protein for the dioxin receptor[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(4): e107157.
- [16] Zhang R, Yang F, Fan H, et al. Long non-coding RNA TUG1/microRNA-187-3p/TESC axis modulates progression of pituitary adenoma via regulating the NF- κ B signaling pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(6): e524.
- [17] Fan S, Popli S, Chakravarty S, et al. Non-transcriptional IRF7 interacts with NF- κ B to inhibit viral inflammation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(4): e107200.
- [18] Xu Q, Yu J, Jia G, et al. Crocin attenuates NF- κ B-mediated inflammation and proliferation in breast cancer cells by down-regulating PRKCQ[J]. *Cytokine*, 2022, 154(6): e155888.
- [19] Daly AF, Beckers A. The epidemiology of pituitary adenomas[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2020, 49(3): 347-355.
- [20] Melmed S, Kaiser UB, Lopes MB, et al. Clinical biology of the pituitary adenoma[J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(6): 1003-1037.
- [21] Xi X, Liu N, Wang Q, et al. ACT001, a novel PAI-1 inhibitor, exerts synergistic effects in combination with cisplatin by inhibiting PI3K/AKT pathway in glioma[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(10): e757.
- [22] Salomon M P, Wang X, Marzese D M, et al. The epigenomic landscape of pituitary adenomas reveals specific alterations and differentiates among acromegaly, cushing's disease and endocrine-inactive subtypes[J]. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2018, 24(17): 4126-4136.
- [23] Zhong W, Yang W, Qin Y, et al. 6-Gingerol stabilized the p-VEGFR2/VE-cadherin/ β -catenin/actin complex promotes microvessel normalization and suppresses tumor progression[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 2019, 38(1): e285.
- [24] Veisi A, Akbari G, Mard S A, et al. Role of crocin in several cancer cell lines: An updated review[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2020, 23(1): 3-12.
- [25] Bakshi H A, Quinn G A, Nasef M M, et al. Crocin inhibits angiogenesis and metastasis in colon cancer via TNF- α /NF- κ B/VEGF pathways[J]. *Cells*, 2022, 11(9): e1502.
- [26] Bi X, Jiang Z, Luan Z, et al. Crocin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on cutaneous squamous cell carcinoma via miR-320a/ATG2B[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 4569-4580.
- [27] Ma W, Huang G, Wang Z, et al. IRF7: role and regulation in immunity and autoimmunity[J]. *Front Immunol*, 2023, 14(10): e1236923.
- [28] Lv Y, Sun S, Zhang J, et al. Loss of RBM45 inhibits breast cancer progression by reducing the SUMOylation of IRF7 to promote IFNB1 transcription[J]. *Cancer Lett*, 2024, 596(1): e216988.
- [29] Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, 121(11): 4377-4385.
- [30] Teng S, Hao J, Bi H, et al. The protection of crocin against ulcerative colitis and colorectal cancer via suppression of NF- κ B-mediated inflammation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12(3): e639458.