

Erastin 联合顺铂诱导顺铂耐药鼻咽癌细胞发生铁死亡

周邓婧¹, 宋启斌^{1,2}, 李娜^{1,2}

(1. 武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060;

2. 湖北省肿瘤精准医学研究中心, 湖北 武汉 430200)

摘要: [目的] 探究铁死亡激活剂 Erastin 联合顺铂(cisplatin, DDP)能否诱导鼻咽癌顺铂耐药细胞发生铁死亡。[方法] CCK-8 法检测鼻咽癌普通细胞株 HNE-1、CEN2Z、HONE-1 和顺铂耐药株 HNE-1/DDP 对 DDP 以及 Erastin 的敏感性, CCK-8 法测定 Erastin、DDP 联合处理后 HNE-1/DDP 细胞活性变化, 流式细胞学检测细胞死亡及细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, Fe^{2+} 和丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒检测细胞 Fe^{2+} 水平和 MDA 水平, Western blot 检测铁死亡相关蛋白表达。[结果] HNE-1/DDP 对 DDP 的敏感度远低于正常 HNE-1 细胞系, Erastin 的 IC_{50} 高达 $(45.89 \pm 6.89) \mu\text{mol/L}$ 。流式细胞学结果显示 Erastin 或 DDP 单独处理 HNE-1/DDP 时, 死亡率不超过 30%, ROS 水平增高不超过 15%。Erastin 联合 DDP 能使 HNE-1/DDP 细胞死亡率提高至 $89.69\% \pm 9.48\%$, ROS 水平提高至 $18.72\% \pm 3.05\%$ 。联合处理还提高了细胞内 Fe^{2+} 和 MDA 水平, 降低了铁死亡相关蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 4(recombinant glutathione peroxidase 4, GPX4)的表达, 且铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 能逆转 Erastin 联合 DDP 所诱导的细胞死亡, 抑制 ROS、 Fe^{2+} 以及 MDA 水平的增高。[结论] Erastin 联合 DDP 能通过降低 GPX4 表达诱导顺铂耐药株 HNE-1/DDP 铁死亡。

关键词: 鼻咽癌; 铁死亡; 耐药; Erastin; 顺铂

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)11-0900-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.11.B002

Erastin Combined with Cisplatin Induce Ferroptosis in Cisplatin-Resistant Nasopharyngeal Carcinoma Cells

ZHOU Deng-jing¹, SONG Qi-bin^{1,2}, LI Na^{1,2}

(1. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Hubei Provincial Research Center for Precision Medicine of Cancer, Wuhan 430200, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of erastin combined with cisplatin(DDP) on ferroptosis in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells. [Methods] CCK-8 method was used to detect the sensitivity of nasopharyngeal carcinoma HNE-1, CEN2Z, HONE-1 cells and cisplatin-resistant HNE-1/DDP cells to cisplatin and erastin. HNE-1/DDP cells were treated with erastin and DDP. The cell death rate and reactive oxygen species(ROS) level of HNE-1/DDP was determined by flow cytometry. The intracellular Fe^{2+} level was assessed using an iron colorimetric assay kit. The levels of malondialdehyde(MDA) were detected with an MDA assay kit. Western blot was used to access the expression of ferroptosis-related protein GPX4. [Results] HNE-1/DDP cell was less sensitive to DDP or erastin, compared with other nasopharyngeal carcinoma cells. The IC_{50} of erastin was $(45.89 \pm 6.89) \mu\text{mol/L}$, and it was significantly decreased to $(17.56 \pm 4.07) \mu\text{mol/L}$ after treatment with DDP and erastin($P < 0.05$). Flow cytometry showed that the death rate of HNE-1/DDP cells treated by erastin or DDP alone was less than 30%, and the ROS level was less than 15%. However, the death rate was increased to $89.69\% \pm 9.48\%$ after treatment with erastin and DDP, and the ROS level increased to $18.72\% \pm 3.05\%$ ($P < 0.05$). The combined treatment also increased intracellular Fe^{2+} and MDA levels, decreased the expression of ferroptosis related protein GPX4, and all of these could be reversed by ferroptosis inhibitor ferrostatin-1. [Conclusion] Erastin combined with cisplatin can significantly induce the ferroptosis of cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma HNE-1/DDP cells by reducing the expression of ferroptosis-related protein GPX4.

Subject words: nasopharyngeal carcinoma; ferroptosis; chemoresistance; erastin; cisplatin

化疗耐药是复发性鼻咽癌患者治疗的一大障碍^[1]。筛选新型安全的化疗增敏剂可以进一步扩大受益人

群,改善鼻咽癌患者预后。铁死亡是一种新的程序性细胞死亡的形式,其不同于细胞凋亡、坏死、焦亡和自噬,特征是铁过载、脂质过氧化和活性氧的累积,能被外源性小分子物质如 Erastin、索拉菲尼、柳氮磺胺吡啶等触发,并且能被铁死亡抑制剂逆转^[2]。

通信作者: 宋启斌, 主任, 教授, 博士研究生导师, 博士; 武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北省武汉市武昌区张之洞路 99 号(430060); E-mail: qibinsong@whu.edu.cn

收稿日期: 2021-08-12; **修回日期:** 2021-10-14

已有很多研究证明小分子铁死亡诱导剂 Erastin 能通过直接抑制细胞谷氨酸/胱氨酸逆转运蛋白 xCT 减少对胱氨酸的摄取,降低细胞谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平,抑制谷胱甘肽过氧化物酶 (recombinant glutathione peroxidase 4, GPX4) 活性,破坏细胞氧化还原稳态,导致细胞氧化死亡,其不但能增强传统抗癌药物(如阿奇霉素、顺铂、阿糖胞苷、替莫唑胺等)对某些癌细胞的化疗效果^[3-4],还能提高癌细胞的放疗敏感性^[5-7]。关于 Erastin 能否增强鼻咽癌细胞对化疗药物的敏感性研究较少。本实验拟研究 Erastin 对鼻咽癌耐药株的化疗增敏作用,为鼻咽癌治疗药物的选择提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人鼻咽癌普通细胞株 HNE-1、CEN2Z、HONE-1 和耐药株 HNE-1/DDP 均购自中南大学高等研究中心,并由本实验室长期冻存。细胞培养液:10%胎牛血清 90% RPMI 1640,双抗 1%,耐药株的细胞培养基另加 10 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂 (cisplatin, DDP) 以维持耐药性,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温细胞培养箱培养。

1.2 细胞存活率计算

细胞消化重悬,调整细胞浓度为 1×10^5 细胞/mL,按 100 μL /孔接种于 96 孔板内,设置不同 Erastin 和 DDP 药物浓度的实验组以及不含细胞的空白组,此外每个浓度 3 个复孔。药物作用 24 h 后,弃孔内液体,每孔加 100 μL 含 10% CCK-8 的 RPMI 1640 溶液,置恒温培养箱避光孵育 1 h,功能读数仪检测 450 nm 波长吸光度 OD 值。细胞存活率 = (OD 实验组 - OD 空白组) / (OD 对照组 - OD 空白组) $\times 100\%$ 。

1.3 PI 染色流式细胞仪测定细胞死亡

将细胞(每孔 2×10^5 个细胞)接种于 6 孔板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h。随后,用 Erastin、DDP、10 $\mu\text{mol/L}$ Ferrostatin-1 和 DMSO 处理细胞 24 h 后,胰酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,加入 10% PI 染色溶液重新悬浮,避光室温孵育 20 min 后 PBS 洗涤 2 次。

1.4 细胞活性氧检测试剂盒检测细胞活性氧水平

将细胞(每孔 2×10^5 个细胞)接种于 6 孔板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h。随后,用 Erastin、DDP 和 DMSO 处理细胞 48 h 后,胰酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤

2 次后无血清培养基重悬,按 1:1 000 将细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 染色液加入细胞悬液中,避光室温孵育 20 min,每 3~5 min 颠倒混匀后无血清培养基洗涤 3 次。

1.5 Fe^{2+} 含量和丙二醛测定

将细胞接种于(每孔 2×10^5 个细胞)6 孔板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h。然后分别用 Erastin 和/或 DDP 处理细胞,添加或不添加 Ferrostatin-1。细胞内 Fe^{2+} 与丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量使用铁比色测定试剂盒与 MDA 检测试剂盒进行测定,实验步骤严格按照说明书进行。

1.6 Western blot 法检测蛋白表达

用含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解细胞 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min,离心 15 min,取上清,按 4:1 加入上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 10 min。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, PVDF 膜转膜 100 min,5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,分别用抗 xCT 抗体、抗 GPX4 抗体、抗 GAPDH 抗体孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。3 次洗膜后用荧光二抗(兔抗)室温孵育 1 h,Odyssey 远红外荧光扫描仪扫描显影。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8.0.1 软件处理数据,采用 t 检验和单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人鼻咽癌细胞株对 DDP 和 Erastin 的敏感性

CCK-8 结果显示,加入不同浓度 DDP 或 Erastin 处理 24 h 后, HNE-1、CEN2Z、HONE-1、HNE-1/DDP 的 DDP IC_{50} 分别约为 (5.04 $\pm$ 0.37) $\mu\text{g/mL}$ 、(14.04 $\pm$ 2.81) $\mu\text{g/mL}$ 、(8.12 $\pm$ 1.56) $\mu\text{g/mL}$ 和 (49.42 $\pm$ 7.04) $\mu\text{g/mL}$, 作用于 HNE-1 和 HNE-1/DDP 的 Erastin IC_{50} 分别约为 (12.08 $\pm$ 3.54) $\mu\text{mol/L}$ 和 (45.89 $\pm$ 6.89) $\mu\text{mol/L}$ 。顺铂耐药株 HNE-1/DDP 对 DDP 和 Erastin 的敏感度均低于其他普通鼻咽癌细胞系 ($F = 84.17$, $P < 0.001$) (Figure 1)。故采用 HNE-1 和 HNE-1/DDP 成对细胞,选取 40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度 DDP 进行后续实验。

2.2 Erastin 联合 DDP 对 HNE-1/DDP 耐药株的影响

CCK-8 结果显示,加入 DDP 后,Erastin+DDP 联合处理 HNE-1/DDP 耐药株 IC_{50} 为 (17.56 $\pm$ 4.07) $\mu\text{mol/L}$ 。

相对于 Erastin 单药组, Erastin+DDP 组细胞的存活率明显下降 ($t=6.132, P=0.004$) (Figure 2A)。与 30 $\mu\text{mol/L}$ Erastin 组 ($49.45\% \pm 7.56\%$) 和 DDP 组 ($66.89\% \pm 4.30\%$) 单药细胞存活率相比, 联合组细胞存活率低 ($19.89\% \pm 8.80\%$), 差异均有统计学意义 (Figure 2B)。可见, Erastin 联合 DDP 能提高 HNE-1/DDP 耐药株对 DDP 的敏感性, 选取 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 Erastin 进行后续实验。

2.3 Erastin、DDP 和 Ferrostatin-1 处理 HNE-1/DDP 耐药株死亡情况

流式细胞学结果显示, 与 DMSO 组相比, Erastin 组和 DDP 组死亡率变化均小于 30%, 组间无统计学差异 ($t=2.754, P=0.051$)。DDP+Erastin 组细胞死亡率高达 $89.69\% \pm 9.48\%$ 。当铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 与 DDP、Erastin 同时处理时, 死亡率由 $89.69\% \pm 9.48\%$ 下降至 $35.81\% \pm 8.2\%$ ($t=10.47, P<0.001$) (Figure 3B), 提示 Erastin 联合 DDP 能协同诱导 HNE-1/DDP 死亡, 这种协同诱导细胞死亡的作用能被 Ferrostatin-1 逆转。

2.4 Erastin、DDP 以及 Ferrostatin-1 处理 HNE-1/DDP 耐药株 ROS 水平的变化情况

相比 DMSO 对照组, Erastin 组 ROS 水平提高 $12.05\% \pm 2.78\%$, DDP 组提高 $3.15\% \pm 1.16\%$, Erastin+DDP 组 ROS 水平升高 $18.72\% \pm 3.05\%$, 与 Erastin 组和 DDP 组相比, 差异均

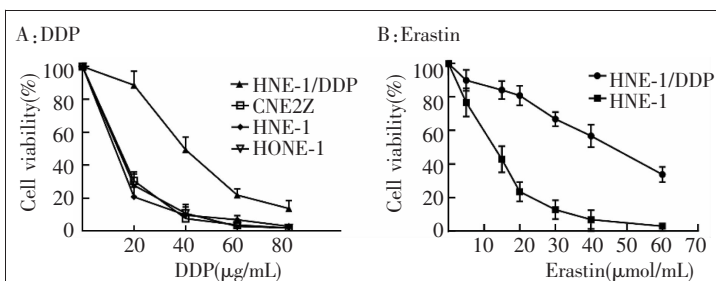


Figure 1 The sensitivity of NPC cell lines to DDP or Erastin

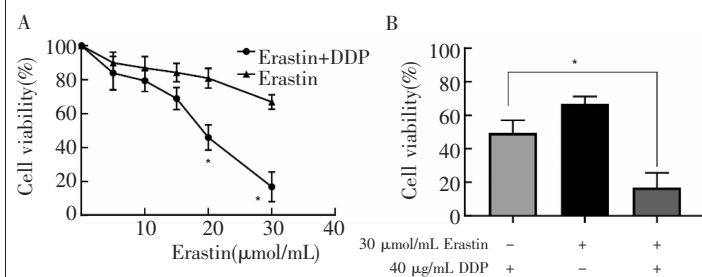


Figure 2 The cell viability of HNE-1/DDP to different medication

有统计学意义。当 Ferrostatin-1 与 DDP、Erastin 同时处理时, 细胞 ROS 水平变化由 $18.72\% \pm 3.05\%$ 降至 $5.08\% \pm 1.89\%$ ($t=6.584, P=0.003$) (Figure 4B), 提示 Erastin 联合 DDP 能提高 HNE-1/DDP 耐药株细胞内 ROS 水平, 且 Ferrostatin-1 能抑制 Erastin 联合 DDP 诱导的 ROS 升高。

2.5 Erastin、Erastin 和 Ferrostatin-1 处理 HNE-1/DDP 耐药株的 Fe^{2+} 与 MDA 水平的变化情况

未加入 DDP 时, DMSO 对照组、Erastin 组 Fe^{2+} 水平均低于 10 $\mu\text{mol/L}$, 无统计学差异 ($t=1.685, P=0.167$); 加入 DDP

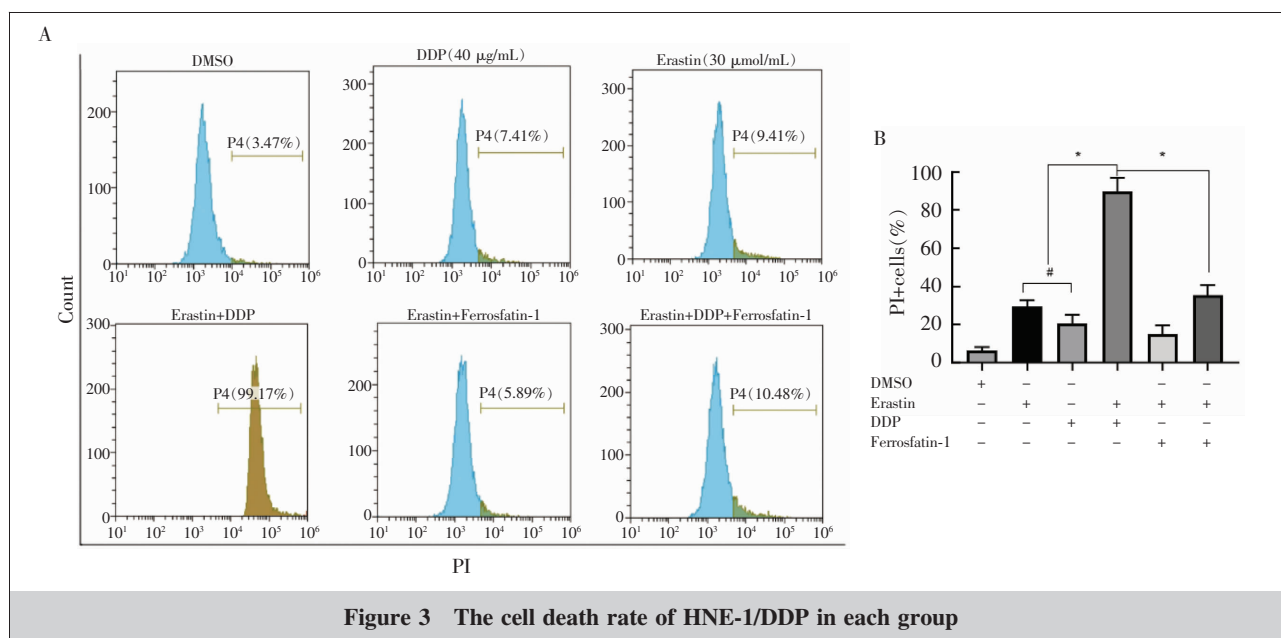


Figure 3 The cell death rate of HNE-1/DDP in each group

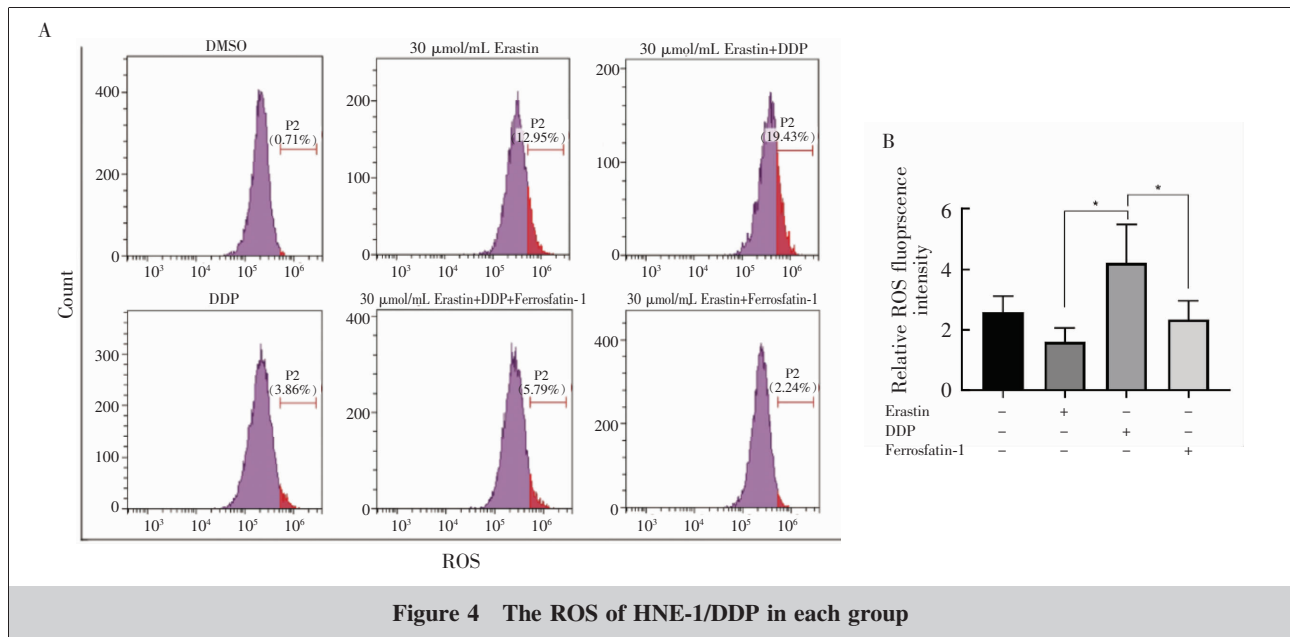


Figure 4 The ROS of HNE-1/DDP in each group

后,Erastin+DDP 组细胞 Fe^{2+} 水平明显提高 $[(15.74 \pm 4.15) \mu\text{mol/L}]$ ($t=3.191, P=0.033$) (Figure 5A)。DMSO 对照组、Erastin 组间 MDA 水平无统计学差异 ($t=1.675, P=0.169$),加入 DDP 后,Erastin+DDP 组MDA水平显著性升高 $[(3.24 \pm 1.08) \text{nmol/mL}]$ ($t=2.944, P=0.042$) (Figure 5B)。当 Ferrostatin-1 与 DDP、Erastin 同时处理后,细胞 Fe^{2+} 水平降低 $[(6.78 \pm 2.3) \mu\text{mol/L vs } (15.74 \pm 4.15) \mu\text{mol/L}, t=3.271, P=0.031]$,MDA 水平降低 $[(0.9 \pm 0.31) \text{nmol/mL vs } (3.24 \pm 1.08) \text{nmol/mL}, t=3.58, P=0.023]$,差异均有统计学意义(Figure 5A、5B),提示 Erastin 联合 DDP 组能提高耐药株 Fe^{2+} 与 MDA 水平,且 Ferrostatin-1 能抑制 Erastin 联合 DDP 诱导 Fe^{2+} 和 MDA 水平的升高。

2.6 Erastin、DDP 以及 Ferrostatin-1 处理 HNE-1/DDP 细胞铁死亡相关蛋白表达水平的变化

Western blot 结果显示,与 DMSO 组细胞相比,Erastin 和 Erastin+DDP 细胞中的 xCT 表达略有下降,但差异无统计学意义 ($t=0.679, P=0.535$),Erastin 组、Erastin+DDP 组的 GPX4 表达明显下降,当 Ferrostatin-1 与 DDP、Erastin 同时处理时 GPX4 表达上升,差异均有统计学意义(Figure 6A~6B),提示 Erastin 与 Erastin+DDP 都能降低 HNE-1/DDP GPX4

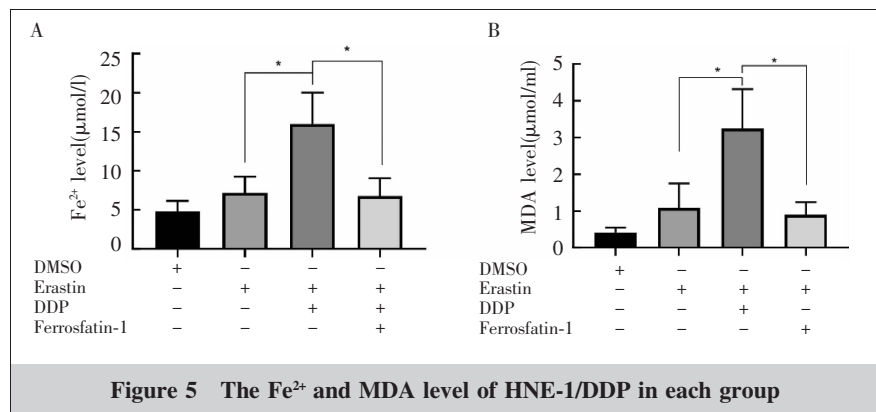
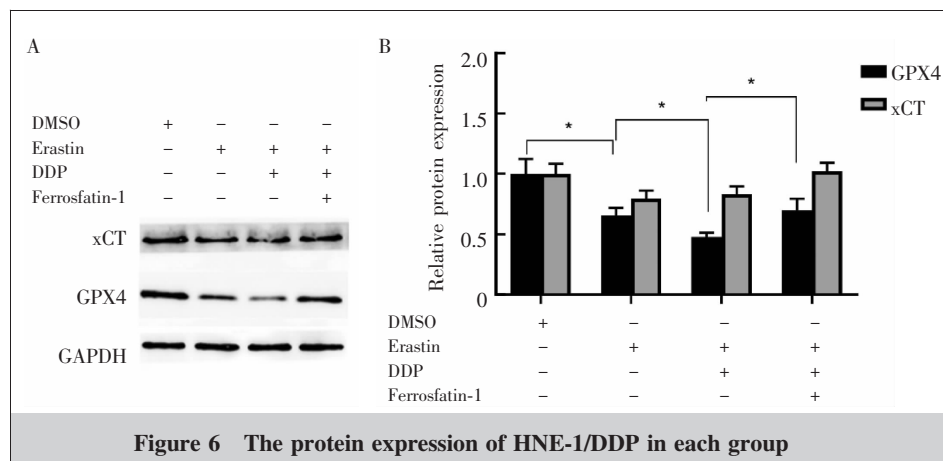


Figure 5 The Fe^{2+} and MDA level of HNE-1/DDP in each group

蛋白的表达,Erastin+DDP 对 GPX4 表达的抑制作用更明显,且 Ferrostatin-1 能逆转 Erastin 联合 DDP 所诱导 GPX4 表达的下降。

3 讨论

顺铂是目前鼻咽癌临床上使用最多的化疗药物之一,DDP 通过与 DNA 结合形成 DDP-DNA 交联物导致细胞 DNA 损伤并诱导线粒体凋亡通路,进而发挥抗肿瘤效应。但由于顺铂使用的次数和剂量积累出现耐药情况,其机制涉及药物转运、周期调控、凋亡及 DNA 损伤修复,但最终均导致 DDP 不能诱导足够的细胞凋亡,无法达到理想杀伤肿瘤细胞的目的^[8]。根据许多研究发现,Erastin 能作为放疗增敏剂,使宫颈癌/非小细胞肺癌对 X 射线更敏感^[5-6],使



喉癌/非小细胞肺癌对 DDP 更敏感^[9-10]。本实验发现,相对于单独加入 DDP,联合适当浓度 Erastin 能使鼻咽癌耐药系细胞发生更多死亡,这与此前报道 Erastin 的化疗增敏作用一致。

Erastin 是经典的铁死亡激活剂,能直接作用于细胞膜表面的 xCT,抑制细胞胱氨酸的摄取,从而抑制内源性抗氧化剂 GSH 合成,导致细胞内氧化还原的失衡产生过量活性氧,而活性氧会破坏细胞内 DNA/RNA、蛋白质和脂质类生物分子,产生有毒氧化产物(如脂质氢过氧化物、MDA 和 4-羟基壬烯醛等),其中细胞膜不饱和脂肪酸的氧化产物磷脂氢过氧化物的堆积被认为是铁死亡的标志^[11];此外,Erastin 还能增加细胞内铁的堆积,为芬顿反应提供不稳定的铁离子,该反应能产生过量的磷脂氢过氧化物诱导细胞发生铁死亡^[12]。研究发现 Erastin 所诱导的铁死亡能被铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 有效抑制^[13]。本研究发现,Erastin 联合 DDP 能显著性抑制鼻咽癌顺铂耐药细胞株的活性,使细胞内 ROS 水平、Fe²⁺水平和 MDA 水平增高,并且这些现象能被铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 有效逆转。因此推测,Erastin 联合 DDP 可能也是通过诱导细胞内铁的堆积、ROS 的升高、MDA 的积累使鼻咽癌顺铂耐药株发生铁死亡。

此外,GPX4 作为磷脂氢过氧化物酶,在 GSH 提供电子的情况下能将有毒的磷脂氢过氧化物转化为无毒的磷脂醇来对抗脂质过氧化,文献报道直接抑制 GPX4 比抑制 GSH 更容易引发癌细胞铁死亡^[14]。本研究发现,Erastin 联合 DDP 能降低鼻咽癌顺铂耐药株 GPX4 的表达,使细胞更容易发生铁死亡。

综上,本实验发现了铁死亡激活剂 Erastin 联合

DDP 可能通过铁死亡途径增强人鼻咽癌细胞株对 DDP 的敏感性,Erastin 可能是克服鼻咽癌化疗耐药的一种有前途的策略。

参考文献:

- [1] Chen YP, Chan A, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394(10192):64-80.
- [2] Xu G, Wang H, Li X, et al. Recent progress on targeting ferroptosis for cancer therapy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 190:114584.
- [3] Cheng Q, Bao L, Li M, et al. Erastin synergizes with cisplatin via ferroptosis to inhibit ovarian cancer growth in vitro and in vivo [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(7): 2481-2491.
- [4] Liang Z, Zhao W, Li X, et al. Cisplatin synergizes with PRLX93936 to induce ferroptosis in non-small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 569:79-85.
- [5] Pan X, Lin Z, Jiang D, et al. Erastin decreases radioresistance of NSCLC cells partially by inducing GPX4-mediated ferroptosis[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3):3001-3008.
- [6] Shibata Y, Yasui H, Higashikawa K, et al. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation in vitro and in vivo [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12):e225931.
- [7] Ye LF, Chaudhary KR, Zandkarimi F, et al. Radiation-induced lipid peroxidation triggers ferroptosis and synergizes with ferroptosis inducers[J]. *ACS Chem Biol*, 2020, 15(2): 469-484.
- [8] Guan S, Wei J, Huang L, et al. Chemotherapy and chemoresistance in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 207:112758.
- [9] Lee J, You JH, Shin D, et al. Inhibition of glutaredoxin 5 predisposes cisplatin-resistant head and neck cancer cells to ferroptosis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(17):7775-7786.
- [10] Li Y, Yan H, Xu X, et al. Erastin/sorafenib induces cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell ferroptosis through inhibition of the Nrf2/xCT pathway[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1):323-333.
- [11] Tang D, Kang R, Berghe TV, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. *Cell Res*, 2019, 29(5):347-364.
- [12] Wiernicki B, Dubois H, Tyurina YY, et al. Excessive phospholipid peroxidation distinguishes ferroptosis from other cell death modes including pyroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10):922.
- [13] Miotto G, Rossetto M, Di Paolo ML, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1 [J]. *Redox Biol*, 2020, 28:101328.
- [14] Wei Y, Lv H, Shaikh AB, et al. Directly targeting glutathione peroxidase 4 may be more effective than disrupting glutathione on ferroptosis-based cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, 1864(4):129539.