

磷酸酶 PHLPP2 抑制 GPX4 活性增强非小细胞肺癌铁死亡诱导剂 RSL3 敏感性的作用分析

王 微^{1,2}, 夏鑫杭², 杨海华², 宋正波^{1,3}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 温州医科大学附属浙江省台州医院, 浙江 台州 317000; 3. 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院), 中国科学院基础医学与肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨磷酸酶 PHLPP2 在铁死亡诱导剂 RSL3 诱导非小细胞肺癌细胞铁死亡发生中的作用及机制。[方法] 体外培养人肺癌细胞株, GPX4 抑制剂 RSL3 处理后 MTT 法检测 RSL3 抑制非小细胞肺癌细胞增殖作用, 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平, Western blot 法检测蛋白表达。流式细胞术检测脂质 ROS 水平, 分别采用逆转录病毒/腺病毒感染上调/下调 PHLPP2 表达, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。[结果] RSL3 有效抑制非小细胞肺癌细胞的活力, RSL3 处理后 HCC827、H1975、H1650、A549 和 H1299 细胞的增殖率分别为 15.22%±2.35%、25.05%±5.92%、4.40%±1.61%、41.48%±10.01% 和 13.17%±2.54%。PHLPP2 表达水平最高的 H1650 细胞对 RSL3 抑制增殖作用最显著, RSL3 抑制增殖作用与 PHLPP2 表达水平呈正比。上调 PHLPP2 表达可以增加 RSL3 对 A549 细胞增殖抑制作用, 并增加铁死亡关键标志脂质 ROS 的累积, A549-vector 和 A549-PHLPP2 组的脂质 ROS 水平分别为 4.34%±0.39% 和 15.36%±0.80% ($P<0.001$); 相反, 下调 PHLPP2 表达 H1650 细胞中, RSL3 对 H1650 细胞增殖抑制作用减弱, 减少了其诱导的脂质 ROS 的累积, H1650-shControl 和 H1650-shPHLPP2 脂质 ROS 水平分别为 14.76%±1.22% 和 4.89%±1.81% ($P=0.0015$)。公共数据库挖掘分析 PHLPP2 与铁死亡关键蛋白 GPX4、SLC7A11 和 ASC14 的相关性, 发现 PHLPP2 与 GPX4 表达呈负相关 ($r=-0.336, P<0.001$)。Western blot 进一步验证了上调 PHLPP2 表达可增强 RSL3 对 GPX4 蛋白的抑制作用。[结论] PHLPP2 促进 GPX4 抑制剂 RSL3 诱导铁死亡发生, 其机制主要通过协同抑制 GPX4 活性。

关键词: 非小细胞肺癌; 铁死亡; PHLPP2

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1671-170X(2022)06-0459-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.06.B004

Phosphatase PHLPP2 Enhances Ferroptosis Inducer RSL3 Sensitivity by Inhibiting GPX4 Activity in Non-small Cell Lung Cancer

WANG Wei^{1,2}, XIA Xin-hang², YANG Hai-hua², SONG Zheng-bo^{1,3}

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Taizhou Hospital of Zhejiang Province Affiliated to Wenzhou Medical University, Taizhou 317000, China; 3. The Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences (Zhejiang Cancer Hospital), Institute of Basic Medicine and Cancer (IBMC), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To explore the effect and mechanism of phosphatase PHLPP2 on ferroptosis inducers (FINs) RSL3 sensitivity in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. [Methods] Human NSCLC cell lines A549, H1650, HCC827, H1975 and H1299 were treated with GPX4 inhibitor RSL3, the cell proliferation was assessed by MTT assay in NSCLC cell lines. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to analyze PHLPP2 expression. Lipid reactive oxygen species (ROS) was assessed by flow cytometry using fluorescent probes C11-BODIPY. Retrovirus/adenovirus transfection was used to up-regulate and down-regulate the expression of PHLPP2 in A549 and H1650 cells, respectively. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was used for comparison between the two groups. [Results] RSL3 effectively inhibited the viability of NSCLC cells. After RSL3 treatment, the proliferation rates of HCC827, H1975, H1650, A549 and H1299 cells were 15.22%±2.35%, 25.05%±5.92%, 4.40%±1.61%, 41.48%±10.01% and 13.17%±2.54%, respectively. Overexpression of PHLPP2 promoted cell death and increased lipid ROS production induced by RSL3 in A549 cells, the lipid ROS production in the A549-vector and A549-PHLPP2 groups were 4.34%±0.39% and 15.36%±0.80%, respectively ($P<0.001$). On the

基金项目: 浙江省基础公益技术研究计划(LGF21H160027); 台州市科技计划项目(2019y09)

通信作者: 杨海华, E-mail: yhh93181@hotmail.com

收稿日期: 2022-01-11; **修回日期:** 2022-02-11

contrary, in H1650 cells with down-regulated PHLPP2 expression, RSL3 attenuated the proliferation inhibition of H1650 cells and reduced the accumulation of lipid ROS induced by RSL3. The levels of lipid ROS of H1650-shControl and H1650-shPHLPP2 were $14.76\% \pm 1.22\%$ and $4.89\% \pm 1.81\%$, respectively ($P=0.015$). Public database mining analysis showed the correlation between PHLPP2 and iron death key proteins GPX4, SLC7A11 and ASCL4. It was found that PHLPP2 was negatively correlated with the expression of GPX4 ($r=-0.336$, $P<0.001$). Western blot further verified that up-regulating the expression of PHLPP2 enhanced the inhibitory effect of RSL3 on GPX4 protein. [Conclusion] PHLPP2 may promote ferroptosis induced by GPX4 inhibitor RSL3 through synergistic inhibition of GPX4 activity.

Subject words: non-small cell lung cancer; ferroptosis; PHLPP2

肺癌是导致全球癌症死亡的首要原因^[1],非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最常见的肺癌类型。铁死亡(ferroptosis)是一种新型的细胞程序性死亡方式,它是一种铁依赖性的细胞内脂质过氧化物聚集所致的非凋亡性死亡^[2]。近年来研究发现铁死亡与肿瘤的发生发展密切相关,越来越多的研究同时也证实靶向铁死亡通路可以提高化疗、免疫治疗、放射治疗等传统抗肿瘤治疗手段的疗效^[3-5]。因此,进一步理解肿瘤对铁死亡诱导剂的敏感性的机制,对于靶向铁死亡的抗肿瘤作用至关重要。目前已发现的诱导铁死亡发生的化合物,即铁死亡诱导剂(ferroptosis inducers, FINs)大致可分为四类:Ⅰ类 FINs 通过抑制 SLC7A11 消耗谷胱甘肽(glutathione, GSH);Ⅱ类 FINs 通过共价结合谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)活性位点的硒半胱氨酸,直接抑制 GPX4 的活性;Ⅲ类 FINs 通过角鲨烯酶-甲羟戊酸途径同时间接消耗 GPX4 和辅酶 Q10 (coenzyme Q10, CoQ10);Ⅳ类 FINs 通过直接的铁超载或血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HMOX1) 的过度活性来增加不稳定的铁池(labile iron pool, LIP),从而诱导铁死亡^[6-7]。其中Ⅱ类 FINs RSL3 直接抑制 GPX4 活性诱导铁死亡,其在肺癌中的易感性受多种机制调节,目前调节机制不明。

PHLPP(PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase)属丝/苏氨酸蛋磷酸脂酶家族,2005 年被 Gao 等^[8]首次在人体中发现,包括 PHLPP1 和 PHLPP2 两种同源异构体。我们前期的研究发现肺癌中 PHLPP1 的表达显著降低,治疗前基线表达水平高的患者拥有更长的总体生存期^[9],且证实提高 PHLPP1 的表达可有效逆转或延缓肺癌细胞对表皮生长因子受体抑制剂(epidermal growth factor receptor

tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKI) 的耐药^[10]。而 PHLPP2 基因位于 16q22.3,编码 PHLPP2 蛋白,由 1 323 个氨基酸组成,过去几年大量研究发现 PHLPP2 在多种肿瘤中表达降低,PHLPP2 表达下调促进肿瘤的发生发展,并与肿瘤治疗抵抗有关^[11-12]。本研究旨在探索 PHLPP2 介导 FINs RSL3 诱导铁死亡发生的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及试剂

人 NSCLC 细胞株 A549、H1650、HCC827、H1975 及 H1299,购于中国科学院上海细胞库。RPMI1640、高糖 DMEM 培养基购于 Hyclon,胎牛血清购自浙江天杭生物科技,RSL-3 购自 MCE。

1.2 细胞培养

除 293T(使用高糖 DMEM 培养液)细胞外,其余所有细胞均使用 RPMI 1640 培养液+10%FBS+1%PS 置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 更换培养液,细胞融合至 80%~90%进行胰酶消化传代。

1.3 MTT 法检测细胞增殖实验

取对数生长期的各组 NSCLC 细胞,计数后接种于 96 孔板,每孔约 3 000 个细胞,待细胞贴壁后给予相应浓度药物处理 72 h,去除培养液后 PBST 漂洗 2 次,4%甲醛溶液固定,然后用 0.5%结晶紫染色,清水漂洗自然晾干后用 1% SDS 溶解,酶标仪 570 nm 测吸光度。Graphpad prism 8.0 软件计算抑制率。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

总蛋白提取,蛋白定量 20 μg 使用 8%~15% SDS-PAGE 电泳分离条带,湿转,5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h,相应一抗 4 °C 孵育过夜,PBST 摇动漂洗

3次,每次15 min;然后加入相应种属二抗,室温孵育1 h,PBST摇动漂洗3次;ECL化学发光显影,采用Image J软件进行条带灰度分析。

1.5 实时荧光定量PCR检测mRNA表达

Trizol法提取总RNA(Invitrogen,Cat#155960178),分光光度计测RNA浓度和纯度;反转录试剂盒将提取的RNA生成cDNA(Applied Biosystems,Cat#4368814),用于后续定量PCR;qRT-PCR采用PowerUp™ SYBR™ Green试剂盒(Applied Biosystems,Cat#26620)。GAPDH作为内参,使用Applied Biosystems 7500系统进行qRT-PCR。引物如下:PHLPP2上游引物:ATGGAGCAGACACTACCACTG,PHLPP2下游引物:GCAAAGGACGAGATGTAAGTCA;GPX4上游引物:GAGGCAAGACCGAAGTAACTAC,GPX4下游引物:CCGAACTGGTTACACGGGAA;GAPDH上游引物:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT,GAPDH下游引物:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG。

1.6 PHLPP2上调/下调稳定细胞系构建

反转录病毒感染A549细胞上调表达PHLPP2,腺病毒感染H1650细胞下调PHLPP2表达。0.5~1.0 μg/mL嘌呤霉素筛选7~10 d得到稳定细胞株。

1.7 流式细胞术检测脂质过氧化活性氧水平

取对数生长期相应细胞以每孔 0.3×10^6 的密度接种在6孔培养皿上并生长过夜。使用DMSO或RSL3处理24 h,将培养基更换为含有2 μM BOD-IPY-581/591C11(Thermo Fisher,Cat# D3861)的2.0 mL培养基,并将细胞放回细胞培养箱中继续培养30 min。然后用PBS洗涤2次,并用不含EDTA的胰酶消化将细胞悬液重悬于PBS中。使用BD FACS Aria细胞计数器通过流式细胞术测定每个样品的细胞的荧光强度。每个条件至少分析3次。

1.8 统计学处理

使用Graphpad prism 8.0版本进行统计分析作图,计量数据采用均数±标准差表示,两样本间比较采用非配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

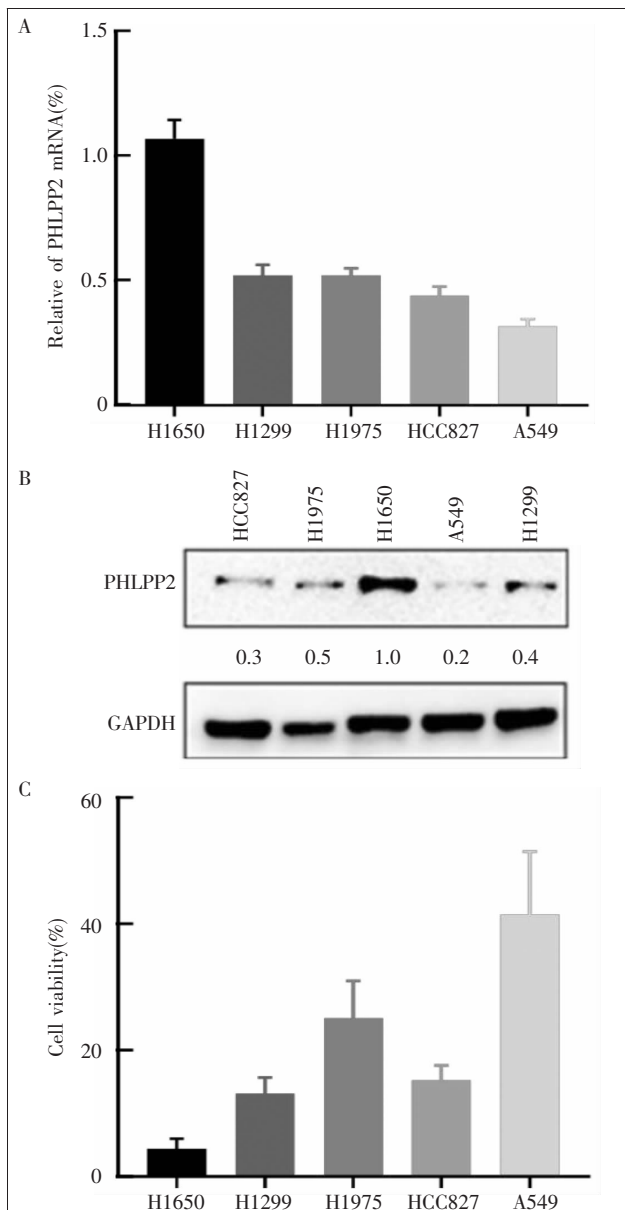
2.1 PHLPP2在NSCLC细胞中的表达

qRT-PCR检测A549、H1650、HCC827、H1975及H1299等6株NSCLC细胞株中PHLPP2 mRNA的相对表达水平(Figure 1A),发现A549的PHLPP2

表达水平最低,H1650的PHLPP2表达水平最高。Western blot进一步证实蛋白表达与mRNA表达一致(Figure 1B)。基于上述结果,选择A549作为PHLPP2过表达稳定细胞株的构建,H1650用于下调表达稳定细胞株的构建,用于后续实验。

2.2 PHLPP2表达水平与RSL3敏感性呈正比

RSL3 10 μM处理NSCLC细胞株72 h,MTT法检测H1650、H1299、H1975、HCC827和A549的增殖



Notes: A: qRT-PCR analysis of PHLPP2 mRNA level in NSCLC cell lines; B: Western blotting analysis of PHLPP2 expression in NSCLC cell lines; C: Cell viability was determined after RSL3 treatment 72 hours by the MTT assay

Figure 1 NSCLC cell lines expressing higher PHLPP2 exhibit increased sensitivity to FINs RSL3

率分别为 $4.41\% \pm 1.61\%$ 、 $13.17\% \pm 2.54\%$ 、 $25.05\% \pm 5.92\%$ 、 $15.22\% \pm 2.35\%$ 和 $41.48\% \pm 10.01\%$ (Figure 1C)。发现 PHLPP2 高表达的 NSCLC 细胞其 RSL3 抑制细胞增殖的能力更强, 提示 PHLPP2 在 RSL3 诱导的细胞死亡中具有重要作用。

2.3 上调 PHLPP2 表达增加 RSL3 诱导 A549 细胞铁死亡

通过反转录病毒感染构建 PHLPP2 过表达 A549 稳定细胞株, 对照组和过表达组分别命名为 A549-Vector 和 A549-PHLPP2。Western blot 验证结果表明 PHLPP2 过表达成功 (Figure 2A)。MTT 法检测过表达 PHLPP2 对 RSL3 敏感性的影响, 发现与对照组相比, A549-PHLPP2 过表达细胞 IC_{50} 值低于对照组 A549-Vector, 分别为 $1.7 \mu M$ 和 $0.23 \mu M$ 。流式细胞检测 RSL3 诱导脂质活性氧产生水平, 发现与对照组相比, 经 RSL3 $1.0 \mu M$ 处理的 PHLPP2 稳定过表达 A549-PHLPP2 细胞脂质体活性氧水平明显上升, 分别为 $4.34\% \pm 0.39\%$ 和 $15.36\% \pm 0.80\%$ ($P < 0.001$) (Figure 2A~2B)。

2.4 下调 PHLPP 表达降低 RSL3 诱导 H1650 细胞铁死亡

通过腺病毒转染构建 PHLPP2 下调表达稳定 H1650 细胞, 命名为 H1650-shPHLPP2, 与 H1650-shControl 相比, H1650-shPHLPP2 细胞对 RSL3 抑制率明显降低, IC_{50} 值提高了近 8 倍, 分别为 $0.52 \mu M$ 和 $2.59 \mu M$ 。流式细胞检测脂质活性氧水平, 发现与对照组相比, 经 RSL3 $1.0 \mu M$ 处理的 PHLPP2 下调组脂质体活性氧水平明显下调, 分别为 $14.76\% \pm 1.22\%$ 和 $4.89\% \pm 1.81\%$ ($P = 0.0015$) (Figure 2C~2D)。

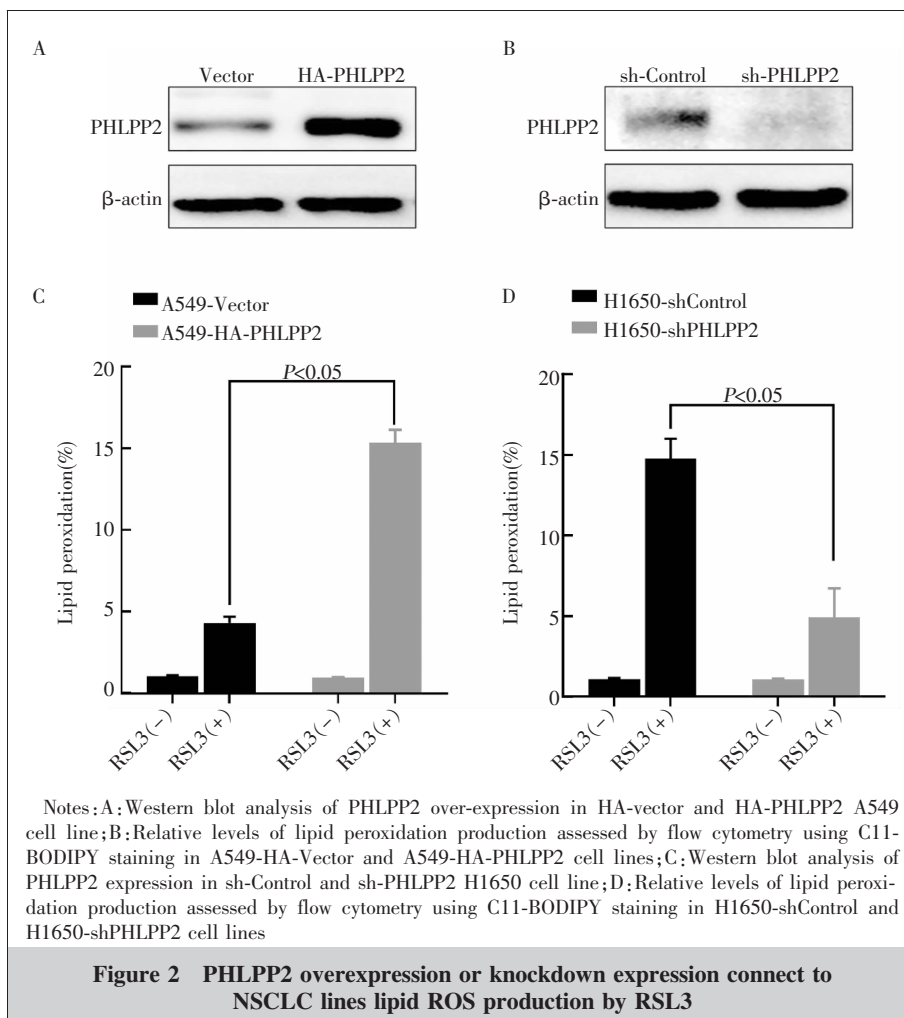
2.5 PHLPP2 通过协同抑制 GPX4 表达增强 RSL3 诱导铁死亡作用

为进一步探究 PHLPP2 在铁死亡中的具体作用机

制, 我们首先利用公共数据库 TCGA (<http://www.cbioportal.org/>)^[13] 在线分析了 PHLPP2 与铁死亡关键分子 SLC7A11、GPX4 和 ACSL4 表达的关联性 (Table 1), 发现在肺腺癌中 PHLPP2 与 GPX4 呈显著负相关 ($r = -0.336$, $P < 0.05$), 但与其 SLC7A11 及 ACSL4 的关联性不明显, 提示 PHLPP2 可能通过抑制 GPX4 增强 RSL3 诱导铁死亡发生。为此, 进一步探索改变 PHLPP2 表达对 RSL3 抑制 GPX4 活性的影响, A549-Vector 和 A549-PHLPP2 分别用 RSL3 $10 \mu M$ 处理 24 h 后, Western blot 检测 GPX4 蛋白表达变化, 发现抑制 GPX4 蛋白表达在 A549-PHLPP2 较对

Table 1 Correlation between PHLPP2 expression and the expression of key components involved in the ferroptosis pathway from TCGA database

Correlated gene	Cytoband	r	P	Q
GPX4	19p13.3	-0.3360	<0.001	<0.001
SLC7A11	4q28.3	-0.0814	0.0682	0.118
ACSL4	Xq23	-0.0320	0.4740	0.577



照组更加显著;相反,H1650 细胞下调 PHLPP2 表达,RSL3 对 GPX4 活性抑制作用明显减弱,进一步证实了 PHLPP2 通过抑制 GPX4 表达诱导铁死亡 (Figure 3)。

3 讨论

肺癌是全球死亡率最高的癌症^[1],近年来尽管治疗取得了一定的进步,其 5 年生存率仍然很低。靶向细胞死亡途径是肿瘤治疗开发的主要路径之一。

铁死亡是最近发现的一种新型细胞死亡形式,其受到多种关键因素的调控,包括溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11,胱氨酸的关键转运体)和 GPX4^[2]。其中,GPX4 能够利用还原型谷胱甘肽降低脂质氢

过氧化物,从而抑制铁死亡发生。因此,通过靶向抑制 GPX4 活性已经成为研发铁死亡诱导剂来靶向铁死亡途径的抗肿瘤治疗的重要手段。以往研究报道化合物 RSL3 可直接灭活 GPX4 活性,从而降低细胞的抗氧化能力,积累活性氧,诱导铁死亡发生^[14]。但是不同类型肿瘤对 RSL3 诱导铁死亡发生敏感性不同,关于介导 RSL3 铁死亡敏感性的分子机制仍不清楚。Kremer 等^[15]发现下调 GOT1 表达增加胰腺癌对 RSL3 诱导铁死亡敏感性;最近的两项研究报道了敲低 FSP1 (又称 AIFM2) 表达的细胞对 RSL3 等铁死亡诱导剂更加敏感,相反过表达 FSP1 可以挽救铁死亡诱导剂抵抗性,证实了 FSP1 是一种有效的铁死亡抵抗因子^[16-17]。因此,进一步探索 FINs 敏感性的分子机制有助于提高其敏感性。本研究发

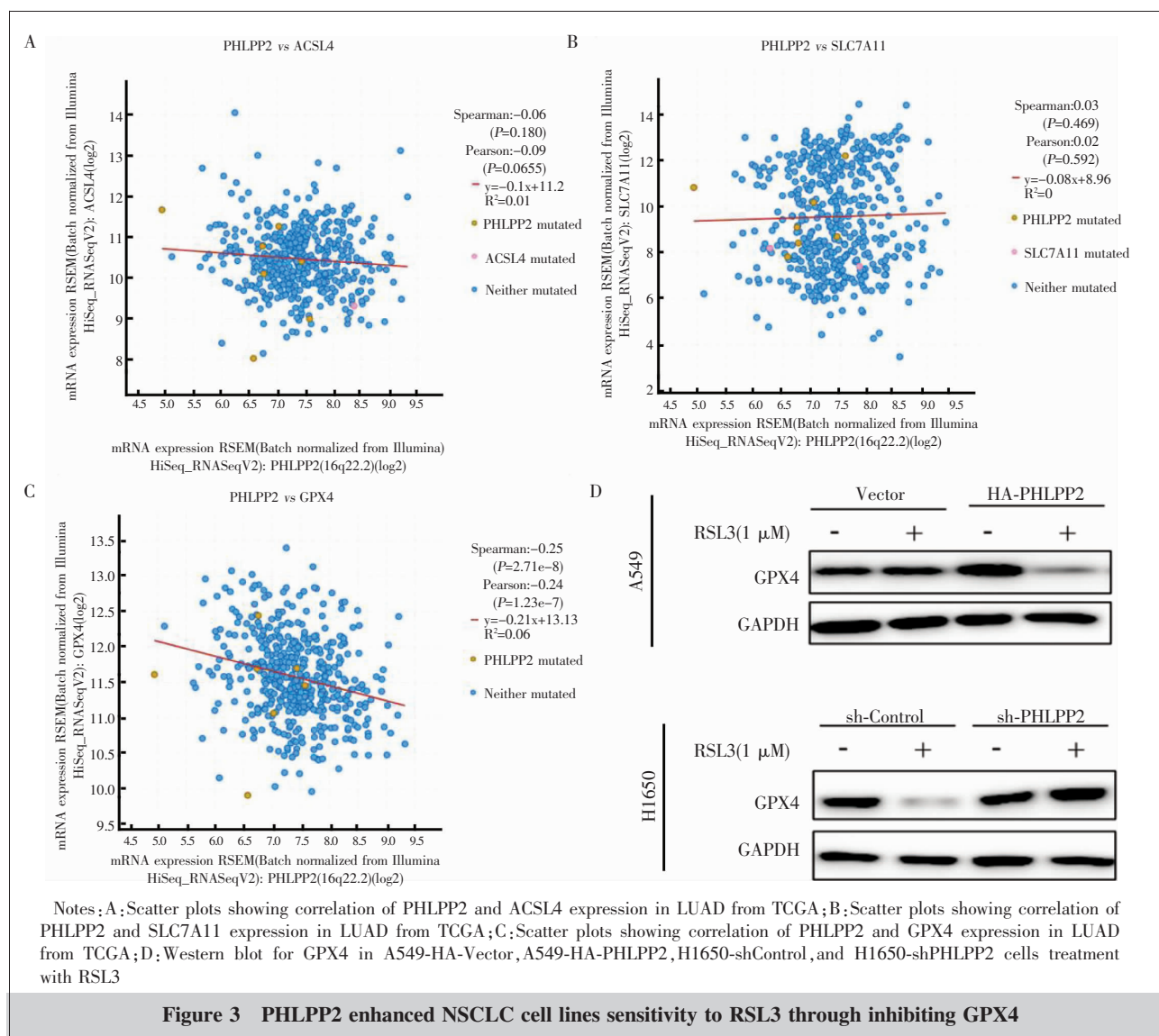


Figure 3 PHLPP2 enhanced NSCLC cell lines sensitivity to RSL3 through inhibiting GPX4

现磷酸酶 PHLPP2 在 RSL3 诱导的铁死亡中具有重要作用,在 RSL3 敏感性低的细胞中过表达 PHLPP2 可提高其敏感性,增加脂质活性氧累积;相反,在 RSL3 敏感的细胞中敲低 PHLPP2 表达, RSL3 敏感性降低,脂质活性氧累积减少。PHLPP2 在其他肿瘤的治疗手段,如靶向治疗、放射治疗等诱导铁死亡发生的抗肿瘤作用值得更深入的研究。

综上所述,本研究发现 PHLPP2 表达通过协同抑制 GPX4 活性增强肺癌细胞对铁死亡诱导剂 RSL3 的敏感性,为铁死亡诱导剂 RSL3 敏感性提供了分子标志物。

参考文献:

- [1] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(3): 63–69.
Cao MM, Chen WQ. Interpretation on the global cancer statistics of GLOBOCAN 2020 [J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science (Electronic Version), 2021, 13(3): 63–69.
- [2] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [3] Lang X, Green MD, Wang W, et al. Radiotherapy and immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of slc7a11[J]. Cancer Discov, 2019, 9(12): 1673–1685.
- [4] 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.
- [5] Wang Y, Zhao G, Condello S, et al. Frizzled-7 identifies platinum-tolerant ovarian cancer cells susceptible to ferroptosis[J]. Cancer Res, 2021, 81(2): 384–399.
- [6] Hassannia B, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Targeting ferroptosis to iron out cancer[J]. Cancer Cell, 2019, 35(6): 830–849.
- [7] Liang C, Zhang X, Yang M, et al. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy[J]. Adv Mater, 2019, 31(51): e1904197.
- [8] Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates AKT, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth[J]. Mol Cell, 2005, 18(1): 13–24.
- [9] Lv D, Yang H, Wang W, et al. High PHLPP expression is associated with better prognosis in patients with resected lung adenocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 687.
- [10] Wang W, Xia X, Chen K, et al. Reduced PHLPP expression leads to EGFR-TKI resistance in lung cancer by activating PI3K-AKT and MAPK-ERK dual signaling [J]. Front Oncol, 2021, 11: 665045.
- [11] Huang H, Pan X, Jin H, et al. PHLPP2 downregulation contributes to lung carcinogenesis following B[a]P/B[a]PDE exposure[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(16): 3783–3793.
- [12] Wang H, Gu R, Tian F, et al. PHLPP2 as a novel metastatic and prognostic biomarker in non-small cell lung cancer patients[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(11): 2124–2132.
- [13] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal[J]. Sci Signal, 2013, 6(269): p1.
- [14] 杜倩宇, 李曼, 王效静. 肺癌化疗抵抗相关因素研究进展[J]. 中国肿瘤, 2021, 30(11): 875–882.
Du QY, Li M, Wang XJ. Research progress on chemotherapy resistance-related factors in lung cancer[J]. China Cancer, 2021, 30(11): 875–882.
- [15] Kremer DM, Nelson BS, Lin L, et al. Got1 inhibition promotes pancreatic cancer cell death by ferroptosis[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4860.
- [16] Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. Nature, 2019, 575(7784): 688–692.
- [17] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor[J]. Nature, 2019, 575(7784): 693–698.