

肺癌上皮间质转化对铁死亡药物的敏感性研究

习舒^{1,2,3}, 刘梦洋³, 郭梦梦^{1,3}, 张晋辉^{1,3}, 明道靖^{1,3}, 戚子昊^{1,3}, 袁帅³, 张祎捷^{1,2}

1. 河南大学临床医学院 (河南开封 475000)
2. 河南大学淮河医院呼吸与危重症医学科 (河南开封 475000)
3. 武汉大学中南医院循证与转化医学中心 (武汉 430071)

【摘要】目的 研究肺癌上皮间质转化 (EMT) 对铁死亡药物敏感性的影响。**方法** 利用生物信息学分析 EMT 相关基因与多种药物治疗敏感性的相关性; 利用流式细胞分选出 E- 钙黏蛋白低表达且 N- 钙黏蛋白高表达、E- 钙黏蛋白高表达且 N- 钙黏蛋白低表达的细胞, 进而模拟肺癌间质细胞和上皮细胞; 通过铁死亡诱导剂 (谷胱甘肽过氧化物酶 4 抑制剂) 和内源性铁死亡诱导剂 (干扰素 γ 联合花生四烯酸) 处理肺癌细胞, 检测比较不同类型肺癌细胞对铁死亡的敏感性。**结果** 细胞对铁死亡的耐受程度与 E- 钙黏蛋白的表达呈正相关, 与波形蛋白、锌指结构 E-box- 结合同源框 1、锌指结构 E-box- 结合同源框 2 的表达呈负相关。铁死亡药物处理结果显示 E- 钙黏蛋白低表达且 N- 钙黏蛋白高表达的细胞对铁死亡药物具有更高的敏感性, 并且可以通过铁死亡抑制剂铁抑素 -1 挽救干扰素 γ 联合花生四烯酸对细胞铁死亡的诱导作用。**结论** 发生 EMT 的肺癌细胞对铁死亡更加敏感, 铁死亡有望成为应对转移和治疗抵抗性肺癌的新策略。

【关键词】 肺癌; 上皮间质转化; 铁死亡

The effect of epithelial-mesenchymal transition on the sensitivity of ferroptosis inducers in lung cancer

Shu Xi^{1,2,3}, Meng-Yang LIU³, Meng-Meng GUO^{1,3}, Jin-Hui ZHANG^{1,3}, Dao-Jing MING^{1,3}, Zi-Hao QI^{1,3}, Shuai YUAN³, Yi-Jie ZHANG^{1,2}

1. School of Clinical Medicine, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China
2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China
3. Center for Evidence-Based and Translational Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: Yi-Jie ZHANG, Email: 13903782431@163.com; Shuai YUAN, Email: yuanshuai021@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the effect of epithelial-mesenchymal transition (EMT) on the sensitivity to ferroptosis inducers in lung cancer. **Methods** Bioinformatics analysis was utilized to assess the relationship between EMT-related genes and the sensitivity of

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202305005

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82002447)

通信作者: 张祎捷, 博士, 教授, 硕士研究生导师, Email: 13903782431@163.com;

袁帅, 博士, 助理研究员, Email: yuanshuai021@whu.edu.cn

<https://ywlxwb.whuzhmedj.com/>

multiple drugs. Cells with low expression of E-cadherin and high expression of N-cadherin or high expression of E-cadherin and low expression of N-cadherin were sorted by flow cytometry to simulate lung cancer epithelial and mesenchymal cells. The sensitivity of different types of lung cancer cells to ferroptosis was compared by treatment with the ferroptosis inducer (GPX4) and endogenous ferroptosis inducers (IFN- γ combined with arachidonic acid). **Results** The resistance to ferroptosis inducers was positively correlated with the expression of E-cadherin and negatively correlated with the expression of vimentin, zinc finger E-box-binding homeobox 1 and zinc finger E-box-binding homeobox 2. Treatment with ferroptosis-inducers revealed that lung cancer cells with low expression of E-cadherin and high expression of N-cadherin were more sensitive to ferroptosis. The ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 could reverse the induction of ferroptosis by IFN- γ combined with arachidonic acid. **Conclusion** Lung cancer cells undergoing EMT are more sensitive to ferroptosis, which could potentially serve as a novel therapeutic strategy for the treatment of metastatic and treatment-resistant lung cancer.

【Keywords】 Lung cancer; Epithelial-mesenchymal transition; Ferroptosis

上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是一种细胞表型转化的过程, 是指上皮细胞向间充质细胞的转化。在 EMT 发生过程中, 上皮细胞标志物会降低 (如由 *CDH1* 基因编码的 E-钙黏蛋白), 和 (或) 间质标志物增加 (由 *CDH2* 基因编码的 N-钙黏蛋白和 *VIM* 基因编码的波形蛋白)^[1]。EMT 与肺癌的转移、侵袭和耐药 (包括化疗和免疫治疗) 等密切相关^[2-4], 被认为是肿瘤发生和进展的重要机制之一, 因此, 靶向 EMT 可能成为癌症治疗的重要策略。

铁死亡是 2012 年报道发现的一种铁依赖性的非凋亡性细胞死亡形式^[5], 是由铁离子、活性氧和含有多不饱和脂肪酸链的磷脂之间的反应引起的新型程序性细胞死亡过程^[6]。诱导细胞发生铁死亡被认为是应对肿瘤治疗抵抗的新策略^[7]。细胞对铁死亡的敏感性高度依赖于细胞代谢状态, 尤其是脂类、铁离子和氨基酸的代谢^[8]。此外, 肿瘤细胞在发生 EMT 转变后通常会对各种治疗方法产生耐药性, 但可能对铁死亡具有较高的敏感性^[9-11]。基于此, 本研究探讨了肺癌细胞中 EMT 现象与铁死亡药物敏感性之间的关联性, 以期为肺癌的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Sorvall Micro 17/17R 微量离心机、NanoDrop One 超微量分光光度计、1300 生物安全柜、HERA cell 150 细胞培养孵箱购自美国 Thermo

Fisher Scientific; L2-6K 台式低速离心机购自湖南可成仪器设备有限公司; IC1000 细胞计数仪购自中国 Countstar; S1000 Thermal Cycler PCR 仪、CFX Connect PCR 仪购自美国 Bio-Rad; FACS Aria 系列流式细胞分选仪购自美国 BD; Alliance Q9 化学发光凝胶成像仪购自英国 Uvitec。

RPMI Medium Modified 细胞培养基 (货号: C11875500BT)、0.25% 胰酶 (货号: 25200-072)、胎牛血清 (货号: A3160802) 购自美国 Gibco; Eastep 总 RNA 提取试剂盒 (货号: LS1040) 购自上海 Promega; 逆转录试剂盒 (货号: RR047A) 购自日本 TaKaRa; (1S, 3R)-RSL3 (货号: HY-100218A)、花生四烯酸 (货号: HY-109590)、干扰素 γ (IFN- γ , 货号: HY-P7025)、铁抑素 -1 (Fer-1, 货号: HY-100579) 购自美国 MCE; CCK8 试剂盒 (货号: CK04) 购自日本 Dojindo; 细胞染色缓冲液 (货号: 420201)、人 TruStain FcX™ 抗体 (货号: 101319)、E-钙黏蛋白抗体 (货号: 324103)、N-钙黏蛋白抗体 (货号: 350807) 购自美国 BioLegend; RIPA 裂解液 (货号: P0013B)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (货号: P1045)、5 \times SDS 上样缓冲液 (货号: P0015L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (货号: A0208) 购自中国碧云天; 10 \times TBST 缓冲液 (货号: T1081) 购自中国 solarbio; PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%, 货号: PG212) 购自中国雅酶; PVDF 膜 (货号: ISEQ00010) 购自美国 Bio-Rad; 谷胱

甘肽过氧化物酶4 (GPX4) 一抗抗体(货号: 125066)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗抗体(货号: 181602)购自英国 Abcam; 超敏 ECL 发光底物(货号: BOLI001)购自中国佰乐基; PCR 引物序列由上海生工合成。

1.2 细胞

肺癌细胞株 A549 (中国科学院细胞库, 目录号: TCHu150)。

1.3 方法

1.3.1 生物信息学分析

根据基因集癌症分析平台(GSCA, <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/GSCA/#/>)综合分析 EMT 相关基因集与多种药物耐药性之间的关系; 根据癌症治疗反应门户(CTRP, <https://portals.broadinstitute.org/ctrp/>)分析上皮标志物 *CDH1* 和间质标志物 *CDH2* 与对铁死亡诱导剂(ML162、ML210 和 RSL3)的耐药性的相关性。

1.3.2 细胞培养

A549 细胞株在 RPMI-1640 培养液中培养, 胎牛血清的含量为 10%。细胞培养箱条件设置为 37℃、5% CO₂。待细胞培养至对数生长期时, 进行后续相应实验。

1.3.3 细胞总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR

根据 Eastep 总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 采用分光光度仪对获得的 RNA 进行定量及纯度鉴定。参照 PrimeScript RT 试剂盒的说明书, 取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。*CDH1* 上游引物序列为 5'-GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG-3', 下游引物序列为 5'-TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG-3'; *CDH2* 上游引物序列为 5'-CCTCCAGAGTTTAC TGCCATGAC-3', 下游引物序列为 5'-GTAGGATC TCCGCCACTGATTC-3'; *VIM* 上游引物序列为 5'-AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA-3', 下游引物序列为 5'-ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT-3'; 内参基因 *β-actin* 上游引物序列为 5'-CCACGAAAC TACCTCAACTCC-3', 下游引物序列为 5'-GTGA TCTCCTTCTGCATCCTGT-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。

1.3.4 流式细胞分选

首先收集 5 × 10⁶ 个 A549 细胞, 加入 2 mL 细胞染色缓冲液洗涤, 350 × g 离心 5 min 后弃上清;

500 μL 细胞染色缓冲液重悬, 在室温条件下于每 100 μL 细胞悬液中加入 5 μL 人 TruStain FcX™ 孵育 10 min, 阻断 Fc 受体; 然后每 100 μL 细胞悬液中分别加入 5 μL E-钙黏蛋白抗体和 N-钙黏蛋白抗体, 并在冰上避光孵育 20 min 进行细胞表面蛋白染色; 最后加入 2 mL 细胞染色缓冲液, 350 × g 离心 5 min, 洗涤细胞两次, 即可进行流式细胞分选。

1.3.5 耐药实验

将细胞铺板至 96 孔板, 每孔 3 × 10³ 个细胞; 37℃ 孵育 24 h 后, 在铁死亡耐药检测实验中, 用铁死亡诱导剂 RSL3 (0, 2, 4 μmol · L⁻¹) 和不同浓度花生四烯酸 (0, 100, 200 μmol · L⁻¹) + IFN-γ (80 ng · mL⁻¹) 处理细胞; 在铁死亡耐药挽救实验中, 用 IFN-γ (80 ng · mL⁻¹)、花生四烯酸 (100 μmol · L⁻¹)、花生四烯酸 (100 μmol · L⁻¹) + IFN-γ (80 ng · mL⁻¹) + Fer-1 (20 μmol · L⁻¹) 处理细胞。72 h 后, 加入 CCK-8 试剂 37℃ 孵育 90 min 检测光密度 (OD) 值, 并计算细胞相对存活率 (%), 公式为实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 × 100%。每组设立 3 个复孔。

1.3.6 蛋白免疫印迹

RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂按照 50 : 1 : 1 的比例制备蛋白裂解液, 混匀后冰上裂解细胞 30 min, 4℃ 条件下 13 000 × g 离心 20 min 后, 取上清与适量 5 × SDS 上样缓冲液混匀于 100℃ 煮沸 10 min; 配置 10% SDS-PAGE 分离胶, 泳道中加入蛋白样, 80 V 电泳 30 min, 150 V 电泳 50 min; 230 mA 转膜 95 min 将蛋白转至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 一抗 (GAPDH 抗体、GPX4 抗体均 1 : 1 000 稀释) 4℃ 过夜孵育; 次日 TBST 室温洗膜 3 次, 每次 5 min; 室温孵育二抗 (1 : 10 000 稀释) 1 h; TBST 室温洗膜 3 次, 每次 5 min; 借助 ECL 发光液使蛋白条带在化学发光凝胶成像仪中显影; Image J 软件对所得图片进行灰度分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用独立样本 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 事后检验采用多重比较的 Tukey 法。采用皮尔逊 (Pearson) 相关分析基因表达与铁死亡药物抵抗性之间的相关性。检验水准为 $\alpha = 0.05$, 所有检验均采用双侧检验。

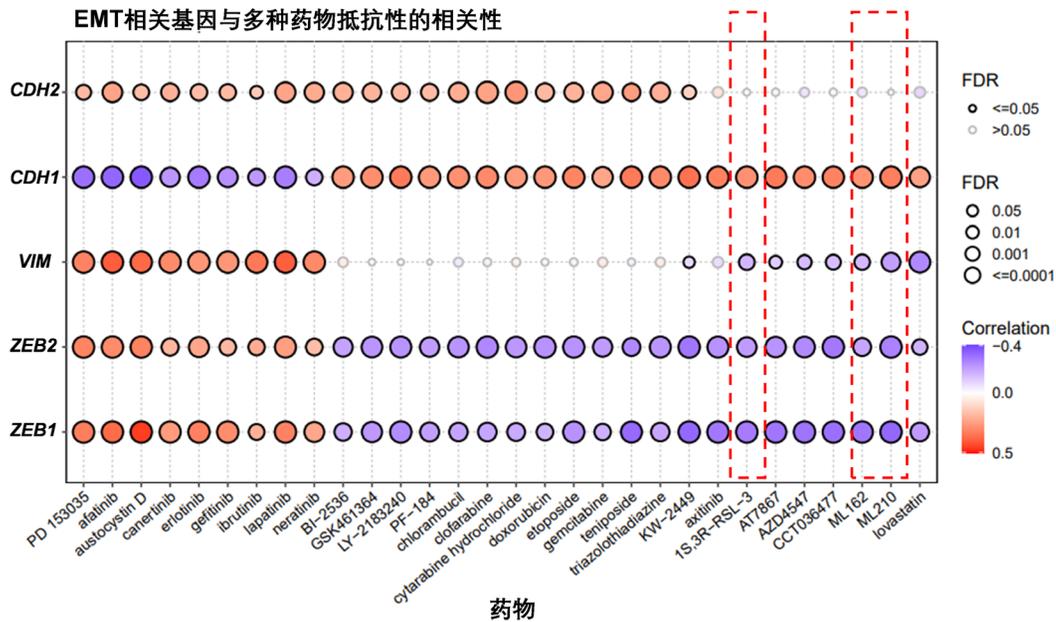
2 结果

2.1 细胞对铁死亡诱导剂的敏感性与EMT相关

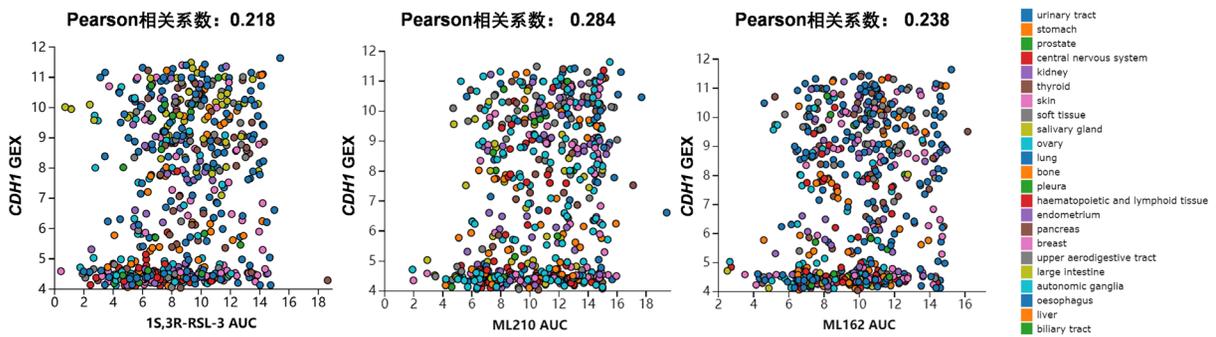
通过 GSCA 数据库综合分析了 EMT 相关基因 [包括上皮标志物 *CDH1*、间质标志物 *CDH2* 和 *VIM*、EMT 转录因子锌指结构 E-box- 结合同

源框 1 (*ZEB1*) 和锌指结构 E-box- 结合同源框 2 (*ZEB2*)] 与多种药物抵抗性的相关性, 结果发现 EMT 相关基因集与多种铁死亡诱导剂 (ML162、ML210 和 RSL3) 耐药性密切相关: 细胞对铁死亡的耐受程度与 *CDH1* 的表达呈正相关, 与 *VIM*、*ZEB1* 和 *ZEB2* 的表达呈负相关 (图 1-A)。

A



B



C

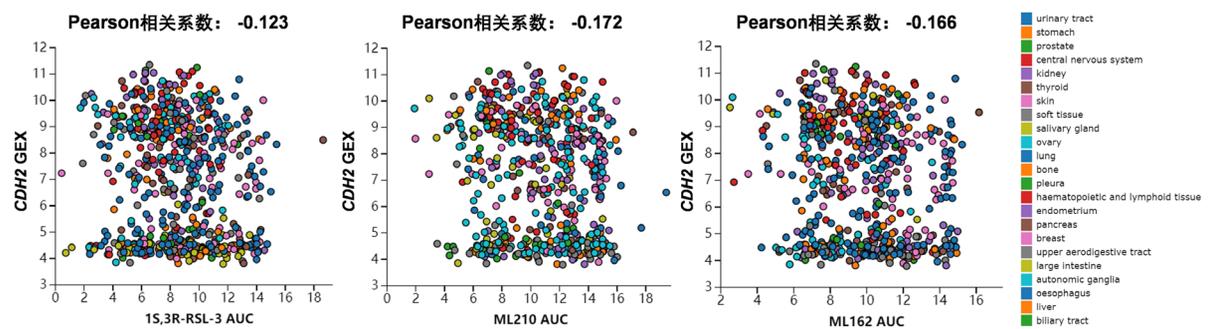


图1 EMT与铁死亡的相关性

Figure 1. The relationship between EMT and ferroptosis

注: A为在GSCA中, EMT相关基因与多种药物抵抗性的相关性; B为在CTRP中, *CDH1* 的表达与对铁死亡诱导剂ML162、ML210和RSL3抵抗性的相关性; C为在CTRP中, *CDH2* 的表达与对铁死亡诱导剂ML162、ML210和RSL3抵抗性的相关性; Pearson相关系数表示两者之间的相关程度; GEX (gene expression) 表示基因表达量; AUC (area under curve) 为每个化合物与肿瘤细胞系间浓度-反应曲线下面积

CDH1 和 *CDH2* 同属于钙依赖性细胞黏附家族分子，分别编码 E-钙黏蛋白和 N-钙黏蛋白，在 EMT 过程中分别作为上皮细胞和间质细胞的标志物^[12]。进一步通过 CTRP 具体分析了 *CDH1* 和 *CDH2* 与铁死亡诱导剂 RSL3、ML210 和 ML162 之间的相关性，并通过皮尔逊 (Pearson) 相关系数进一步说明了在多种肿瘤中，*CDH1* 的表达与对铁死亡药物抵抗性呈正相关，*CDH2* 的表达与对铁死亡药物抵抗性呈负相关 (图 1-B 和 1-C)。以上结果提示，在 EMT 过程中，上皮细胞对铁死亡诱导剂更耐受，而间质细胞对铁死亡诱导剂更敏感。

2.2 间质化表型细胞对铁死亡诱导剂更敏感

为了验证发生 EMT 的肺癌细胞对铁死亡诱导剂更敏感，采用流式分选出肺癌细胞株 A549 中 E-钙黏蛋白低表达且 N-钙黏蛋白高表达 (称为 A549-E_低N_高) 和 E-钙黏蛋白高表达且 N-

钙黏蛋白低表达 (称为 A549-E_高N_低) 细胞 (图 2-A)，分别模拟肺癌间质细胞和上皮细胞。通过 qRT-PCR 验证了 A549-E_低N_高 细胞表达更低的 *CDH1*，和更高的 *CDH2* 和 *VIM*，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，提示细胞分选成功 (图 2-B)。接下来，利用不同浓度铁死亡诱导剂 RSL3 (0, 2, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 A549-E_低N_高 和 A549-E_高N_低 细胞，结果发现，A549-E_低N_高 细胞表现出对铁死亡诱导剂更高的敏感性，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2-C)。进一步通过蛋白免疫印迹实验检测了 A549-E_低N_高 和 A549-E_高N_低 细胞中 GPX4 蛋白的丰度，电泳条带灰度分析后显示 A549-E_低N_高 细胞中 GPX4 条带灰度更低，提示 A549-E_低N_高 细胞较 A549-E_高N_低 细胞表达更低水平的 GPX4 蛋白 (图 2-D)。以上结果表明具有间质化表型的肺癌细胞对铁死亡诱导剂更加敏感，提示 EMT 转化后的肿瘤细胞对铁死亡的抵抗性减弱。

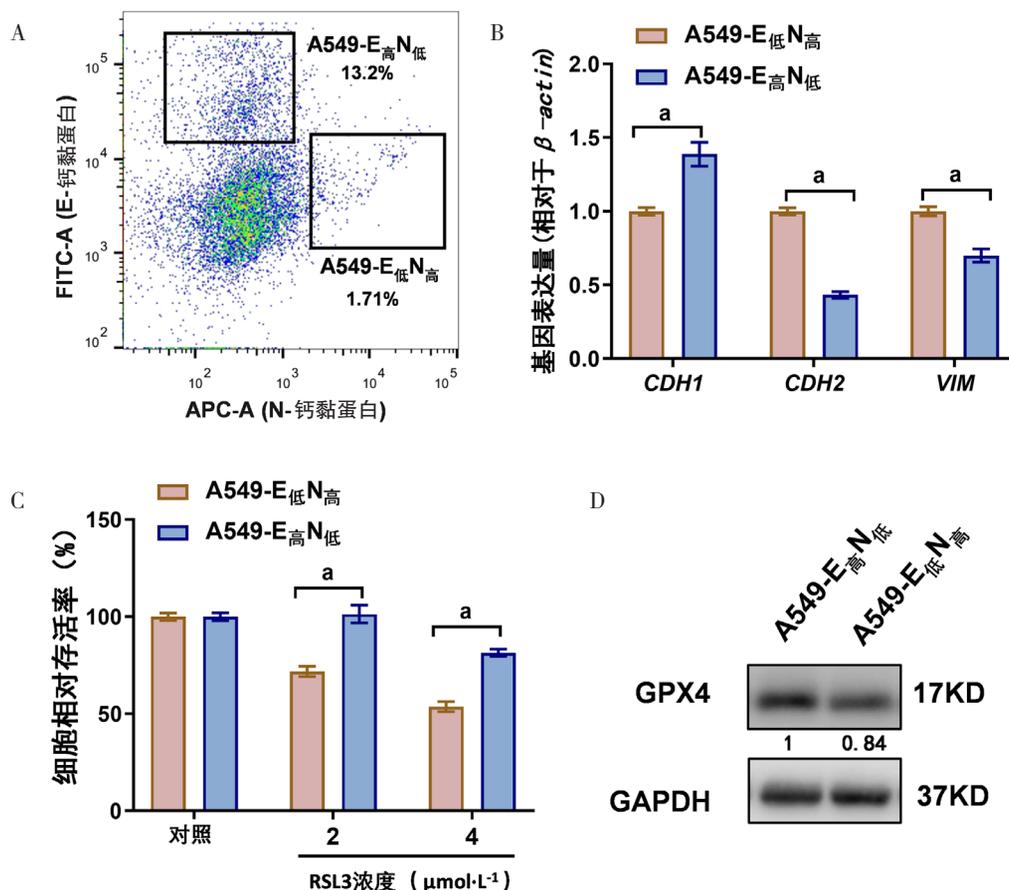


图2 间质化表型细胞对铁死亡诱导剂更敏感

Figure 2. Mesenchymal cells are more sensitive to ferroptosis inducers

注：A为流式分选出A549-E_低N_高 (右下)和A549-E_高N_低 (左上)细胞；B为实时荧光定量PCR实验验证A549-E_低N_高和A549-E_高N_低细胞中*CDH1*、*CDH2*和*VIM*的表达水平，采用独立样本t检验， $P < 0.05$ ；C为不同浓度RSL3处理A549-E_低N_高和A549-E_高N_低的细胞活力，A549-E_低N_高与A549-E_高N_低比较，采用独立样本t检验， $P < 0.05$ ；D为蛋白免疫印迹实验，通过条带灰度反映A549-E_高N_低和A549-E_低N_高细胞的GPX4蛋白丰度的高低，A549-E_低N_高与A549-E_高N_低比较，GPX4条带灰度更低，GAPDH为内参

2.3 间质化表型细胞对IFN- γ 联合花生四烯酸诱导的铁死亡更敏感

为探究 A549-E_低N_高 细胞是否对 IFN- γ 联合花生四烯酸诱导肿瘤细胞发生由长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL4) 介导的免疫原性铁死亡^[13] 同样更敏感, 利用 IFN- γ 联合不同浓度花生四烯酸分别处理 A549-E_低N_高 和 A549-E_高N_低 细胞, 结果如预期一

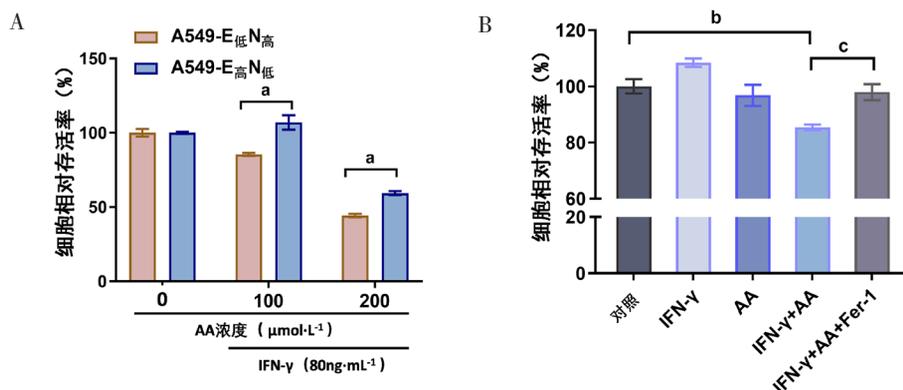


图3 间质化表型细胞对IFN- γ 联合花生四烯酸诱导的铁死亡具有高敏感性

Figure 3. Mesenchymal cells are highly sensitive to IFN- γ combined with arachidonic acid

注: AA为花生四烯酸; A为不同浓度花生四烯酸(0, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合IFN- γ (80 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理A549-E_低N_高和A549-E_高N_低的细胞活力, 采用独立样本t检验, A549-E_低N_高与A549-E_高N_低比较, ^a $P < 0.05$; B为IFN- γ (80 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、花生四烯酸(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、花生四烯酸(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + IFN- γ (80 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、花生四烯酸(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + IFN- γ (80 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) + Fer-1 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理A549-E_低N_高的细胞活力, 采用单因素方差分析, 与对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与花生四烯酸 + IFN- γ + Fer-1组比较, ^c $P < 0.05$

3 讨论

本研究通过生信分析发现发生 EMT 的肿瘤对铁死亡药物的敏感性更高。为了验证这一观点, 本课题组通过流式细胞分选出了 E- 钙黏蛋白低表达且 N- 钙黏蛋白高表达、E- 钙黏蛋白高表达且 N- 钙黏蛋白低表达的细胞, 分别模拟间质细胞和上皮细胞, 并在发现间质细胞 (E- 钙黏蛋白低表达且 N- 钙黏蛋白高表达) 表现出了对铁死亡 (包括 RSL3、IFN- γ 联合花生四烯酸) 更高的敏感性。本研究证明了发生 EMT 的肺癌细胞对铁死亡更加敏感, 为靶向 EMT 的临床治疗提供了新的策略。

肺癌的发生可能受到多种内在因素及外在因素的综合诱导, 伴随着一系列基因的表达失控, 进而导致肺癌的恶性进展^[14]。由于早期临床症状不明显且缺乏早期的诊断方法, 肺腺癌的诊断往往处于中晚期。多数中晚期转移性肺癌患者容易对多种治疗方案产生耐药^[3], 尽管目前关于多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂安罗替尼的临床研究已经取得一定进展^[15], 利用信迪利单抗联合化疗

样, A549-E_低N_高 细胞对铁死亡更敏感, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3-A)。并且通过铁死亡抑制剂 Fer-1 成功挽救了 IFN- γ 联合花生四烯酸对 A549-E_低N_高 细胞的铁死亡诱导作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进而说明 IFN- γ 联合花生四烯酸是通过铁死亡的方式杀伤了 A549 细胞 (图 3-B)。以上结果表明, 具有间质化表型的细胞对免疫原性铁死亡也更加敏感。

的治疗方案^[16], 能显著提高晚期肺癌患者控制率, 但是治疗成本相对较高。EMT 已被确定为肿瘤发生和进展的主要因素之一, 其赋予癌细胞转移特性 (增强移动性、侵袭性)、干细胞特性, 以及治疗耐药性^[17]。在癌症进展或凋亡刺激 (包括治疗性) 条件下, 上皮来源的肿瘤细胞发生 EMT 转变, 改变肿瘤细胞特征 (如细胞极性和细胞间连接的改变), 并增加间充质标志物 (如 N- 钙黏蛋白和波形蛋白) 的表达^[18-19]。EMT 不仅促使肺癌细胞发生转移和侵袭, 更赋予肺癌细胞更强的治疗抵抗, 如化疗抵抗和靶向治疗抵抗^[20]。因此, 靶向 EMT 可能为转移性和治疗抵抗性肺癌患者的治疗提供新的策略。本研究首先通过生信分析发现了 EMT 相关基因集的表达与几种铁死亡诱导剂的敏感性具有相关性, 上皮标志物基因 *CDH1* 的表达与铁死亡诱导剂的耐药性呈正相关, 间质标志物基因 *CDH2*、*VIM*、EMT 转录因子 *ZEB1* 和 *ZEB2* 的表达与铁死亡诱导剂的耐药性呈负相关, 均提示了发生上皮间质化的细胞可能对铁死亡诱导剂更敏感。

铁死亡是一种由脂质过氧化引起的新型细胞

程序性死亡,本质是细胞内脂质氧化物的代谢障碍,进而在铁离子的催化下异常代谢,发生大量脂质过氧化,破坏细胞内氧化还原平衡,攻击生物大分子,触发细胞死亡^[21]。诱发细胞铁死亡被认为是一种有前景的肿瘤治疗策略^[22-23]。研究^[9]表明,EMT 会促使肿瘤细胞发生治疗抵抗成为难治性肿瘤;然而,发生 EMT 也会表现出对铁死亡的易感性。当癌细胞在 EMT 过程中失去上皮表型并获得间充质特性时,会伴随着多不饱和脂肪酸合成和新陈代谢的增加,从而促进炎症浸润并导致更多的脂质过氧化物。多不饱和脂肪酸的过氧化增加使这些癌细胞容易受到铁死亡的影响^[24]。这一代谢过程发生在大多数肿瘤中,目前已报道在头颈部肿瘤^[25]、黑色素瘤^[26]、胰腺癌^[27]、恶性间皮瘤^[28]、结直肠癌^[29]和乳腺癌^[30]中发生 EMT 的同时具有对铁死亡的易感性。如在黑色素瘤中 EMT 转录因子 *ZEB1* 促进癌症转移,并通过调节细胞脂质代谢促进了癌细胞对靶向 GPX4 的铁死亡诱导剂的敏感性^[10]。在恶性间皮瘤的上皮细胞中,E-钙黏蛋白介导的细胞间相互作用抑制 EMT,但通过细胞内 Merlin-Hippo 信号通路抑制了肿瘤细胞对铁死亡的敏感性^[28]。本研究利用 A549 肺腺癌细胞株作为模型,流式分选出 E-钙黏蛋白低表达且 N-钙黏蛋白高表达和 E-钙黏蛋白高表达且 N-钙黏蛋白低表达的细胞,证明了 E-钙黏蛋白更低表达和 N-钙黏蛋白更高表达的细胞对铁死亡诱导剂 RSL3 的敏感性更高,说明了间质细胞具有更高的铁死亡敏感性。

IFN- γ 是一种重要的细胞因子,可以通过激活免疫系统,增强细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的活性,发挥抗肿瘤、免疫调节和抗病毒等作用,从而抑制肿瘤生长和扩散。IFN- γ 还可以通过抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞分化等机制发挥抗肿瘤作用^[31]。花生四烯酸是一种多不饱和脂肪酸,是人体必需脂肪酸之一。其是一种重要的信号分子,在调节细胞生长和肿瘤发生中具有重要作用,可以通过多种机制发挥抗肿瘤作用^[32]。首先,花生四烯酸可以抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭,从而抑制肿瘤的生长和转移。其次,花生四烯酸可以诱导肿瘤细胞凋亡,从而使肿瘤细胞死亡。此外,花生四烯酸还可以抑制肿瘤细胞的血管生成和转移,从而减少肿瘤的血供,使其生长受限。近来研究

表明,IFN- γ 联合花生四烯酸可以发挥协同作用,诱导肿瘤细胞发生由 ACSL4 介导的免疫原性铁死亡,显著增强其抗肿瘤效果^[13]。IFN- γ 有较强的免疫调节功能,能抑制滑膜纤维母细胞,目前临床上已应用于类风湿关节炎患者且得到了较好的疗效;而花生四烯酸是一种人体内源性必需脂肪酸。本课题组证明了 IFN- γ 联合花生四烯酸增强了 E-钙黏蛋白低表达且 N-钙黏蛋白高表达细胞的铁死亡敏感性,提示 IFN- γ 联合花生四烯酸有望成为 EMT 转变的肿瘤细胞的潜在治疗策略。

综上所述,本研究证明了发生 EMT 的肺癌细胞对铁死亡更加敏感,为应对 EMT 引起的肺癌转移以及治疗抵抗提供了新的治疗策略。

参考文献

- 1 Singh M, Yelle N, Venugopal C, et al. EMT: Mechanisms and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 80-94. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.
- 2 De Craene B, Berc G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2): 97-110. DOI: 10.1038/nrc3447.
- 3 Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10): 611-629. DOI: 10.1038/nrcclinonc.2017.44.
- 4 Taki M, Abiko K, Ukita M, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial-mesenchymal transition[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(17): 4669-4679. DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-20-4459.
- 5 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- 6 Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- 7 Zhang C, Liu X, Jin S, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 47. DOI: 10.1186/s12943-022-01530-y.
- 8 Chen X, Li J, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081. DOI:

- 10.1080/15548627.2020.1810918.
- 9 Ebrahimi N, Adelian S, Shakerian S, et al. Crosstalk between ferroptosis and the epithelial–mesenchymal transition: implications for inflammation and cancer therapy[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022, 64: 33–45. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.01.006.
 - 10 Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, et al. Dependency of a therapy–resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway[J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 453–457. DOI: 10.1038/nature23007.
 - 11 Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, et al. Drug–tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition[J]. *Nature*, 2017, 551(7679): 247–250. DOI: 10.1038/nature24297.
 - 12 Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E–cadherin and N–cadherin switch in epithelial–to–mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118. DOI: 10.3390/cells8101118.
 - 13 Liao P, Wang W, Wang W, et al. CD8+ T cells and fatty acids orchestrate tumor ferroptosis and immunity via ACSL4[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(4): 365–378.e6. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.02.003.
 - 14 王娟, 韩旭, 赵宁, 等. 长链非编码 RNA 在非小细胞肺癌中的研究进展 [J]. *医学新知*. [Wang J, Han X, Zhao N, et al. The research progress into long non–coding RNA in non–small cell lung cancer[J]. *New Medicine*.] DOI: 10.12173/j.issn.1004–5511.202207025.
 - 15 沈姗, 杨洁, 刘云霞. 安罗替尼治疗晚期非小细胞肺癌的快速卫生技术评估 [J]. *医学新知*, 2021, 31(5): 350–356. [Shen S, Yang J, Liu YX. Rapid health technology assessment of anlotinib in treatment of advanced non–small cell lung cancer[J]. *New Medicine*, 2021, 31(5): 350–356.] DOI: 10.12173/j.issn.1004–5511.202102017.
 - 16 苏广全, 张旭东, 方萍萍. 信迪利单抗一线治疗晚期鳞状非小细胞肺癌的成本–效用分析 [J]. *药物流行病学杂志*, 2022, 31(11): 756–760. [Su GQ, Zhang XD, Fang PP, et al. Cost–utility analysis of first–line treatment of advanced squamous non–small cell lung cancer with sintilimab[J]. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, 2022, 31(11): 756–760.] DOI: 10.19960/j.cnki.issn1005–0698.2022.11.007.
 - 17 Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395–412. DOI: 10.1146/annurev–pathol–020117–043854.
 - 18 Paolillo M, Schinelli S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4947. DOI: 10.3390/ijms20194947.
 - 19 Khanbabaei H, Ebrahimi S, García-Rodríguez JL, et al. Non–coding RNAs and epithelial mesenchymal transition in cancer: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 278. DOI: 10.1186/s13046–022–02488–x.
 - 20 Xie S, Wu Z, Qi Y, et al. The metastasizing mechanisms of lung cancer: Recent advances and therapeutic challenges[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111450. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111450.
 - 21 Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369–379. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.
 - 22 Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273–285. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
 - 23 Yan HF, Zou T, Tuo QZ, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 49. DOI: 10.1038/s41392–020–00428–9.
 - 24 Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(34): E4966–4975. DOI: 10.1073/pnas.1603244113.
 - 25 Lee J, You JH, Kim MS, et al. Epigenetic reprogramming of epithelial–mesenchymal transition promotes ferroptosis of head and neck cancer[J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101697. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101697.
 - 26 Wang M, Li S, Wang Y, et al. Gambogic acid induces ferroptosis in melanoma cells undergoing epithelial–to–mesenchymal transition[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 401: 115110. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115110.
 - 27 Sato M, Matsumoto M, Saiki Y, et al. BACH1 promotes pancreatic cancer metastasis by repressing epithelial genes and enhancing epithelial–mesenchymal transition[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(6): 1279–1292. DOI: 10.1158/0008–5472.
 - 28 Wu J, Minikes AM, Gao M, et al. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2–YAP signalling[J].

- Nature, 2019, 572(7769): 402–406. DOI: 10.1038/s41586-019-1426-6.
- 29 Chen P, Li X, Zhang R, et al. Combinative treatment of β -elemene and cetuximab is sensitive to KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial–mesenchymal transformation[J]. Theranostics, 2020, 10(11): 5107–5119. DOI: 10.7150/thno.44705.
- 30 Müller S, Sindikubwabo F, Cañeque T, et al. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis[J]. Nat Chem, 2020, 12(10): 929–938. DOI: 10.1038/s41557-020-0513-5.
- 31 Jorgovanovic D, Song M, Wang L, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review[J]. Biomark Res, 2020, 8: 49. DOI: 10.1186/s40364-020-00228-x.
- 32 Yarla NS, Bishayee A, Sethi G, et al. Targeting arachidonic acid pathway by natural products for cancer prevention and therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2016, 40–41: 48–81. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.02.001.

收稿日期: 2023 年 04 月 01 日 修回日期: 2023 年 04 月 17 日
 本文编辑: 钟巧妮 杨燕