

PTEN通过抑制GCLM表达促进铁死亡

尚柯卓 吴玉婷 刘芳铭*

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 生理学系, 北京 100005)

摘要 为探讨抑癌基因*Pten*在铁死亡中的作用及其潜在的机制, 该文将*Pten*基因缺失小鼠胚胎成纤维细胞(*Pten*^{-/-})与其对照野生型细胞(*Pten*^{+/+})用不同浓度的铁死亡诱导剂(Erastin)处理, 或在Erastin处理的同时分别加入抗氧化剂、铁死亡抑制剂、坏死性凋亡抑制剂、凋亡抑制剂和自噬抑制剂, 用CCK-8法检测细胞增殖能力; PI染色检测细胞死亡情况; 用流式细胞测量术检测细胞脂质过氧化物水平, 组织细胞谷胱甘肽检测试剂盒检测谷胱甘肽水平; 蛋白质免疫印迹检测PTEN、P-AKT⁴⁷³、AKT和GCLM蛋白表达水平; RT-qPCR检测*Gclm* mRNA表达水平; Erastin处理GCLM敲低组与对照组, 用CCK-8法检测细胞增殖能力。实验结果显示, 与对照组相比, *Pten*^{-/-}细胞对Erastin的耐受性增强($P<0.05$); Erastin诱导的*Pten*^{+/+}细胞死亡可以被抗氧化剂和铁死亡抑制剂逆转, 不能被坏死性凋亡抑制剂、凋亡抑制剂、自噬抑制剂逆转($P<0.05$); Erastin处理后, 与对照组相比*Pten*^{-/-}细胞中脂质过氧化物水平(铁死亡检测指标)降低($P<0.05$), 这些结果表明PTEN缺失能减弱细胞对铁死亡的敏感性。在机制上我们发现, 与对照组相比*Pten*^{-/-}细胞中谷胱甘肽水平升高($P<0.05$), GCLM的mRNA和蛋白水平升高($P<0.05$); *Pten*^{-/-}细胞中敲低GCLM能增加细胞对Erastin的敏感性($P<0.05$)。综上所述, PTEN能够通过抑制GCLM表达来提高细胞内脂质过氧化水平从而促进铁死亡发生。

关键词 PTEN; GCLM; 铁死亡; 谷胱甘肽

PTEN Promotes Ferroptosis by Inhibiting GCLM Expression

SHANG Kezhuo, WU Yuting, LIU Fangming*

(Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China)

Abstract To investigate the role of tumor suppressor *Pten* in ferroptosis and the mechanism, the *Pten*-deleted mouse embryonic fibroblasts (*Pten*^{-/-} MEFs) and its wild-type (*Pten*^{+/+}) ones were treated with ferroptosis-inducing agent (Erastin), with or without ROS scavenging agent, ferroptosis inhibitor, necroptosis inhibitor, caspase inhibitor and autophagy inhibitor. Quantification of cell viability was measured by CCK-8 assay. The levels of lipid hydroperoxide and PI staining analysis were measured by flow cytometry. The level of glutathione was detected by Glutathione Assay Kit. PTEN, P-AKT⁴⁷³, AKT and GCLM protein expression levels were detected by Western blot. *Gclm* mRNA expression was measured by RT-qPCR. *Gclm*-knockdown *Pten*^{-/-} MEFs and control group were treated with Erastin, and then the quantification of cell viability was measured by CCK-8 assay. The results showed that compared with the control group, *Pten*^{-/-} MEFs were more resistant to Erastin ($P<0.05$). Erastin-induced *Pten*^{+/+} cell death was reversed by ROS scavenging agent and ferroptosis inhibitor, but not by necroptosis inhibitor, caspase inhibitor and autophagy inhibitor ($P<0.05$). In addition, lipid ROS level, the marker of ferroptosis, was decreased in

收稿日期: 2021-12-30

接受日期: 2022-03-28

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81572463)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15910890921, E-mail: lfmpumc@163.com

Received: December 30, 2021 Accepted: March 28, 2022

This work was supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81572463)

*Corresponding author. Tel: +86-15910890921, E-mail: lfmpumc@163.com

Pten^{-/-} cells. These data indicated that *Pten*-deficiency attenuated the sensitivity of cells to Erastin. Mechanistically, the glutathione levels were increased in *Pten*^{-/-} cells ($P < 0.05$). mRNA and protein levels of *Gclm*, which played critical roles in glutathione production, were increased in *Pten*^{-/-} MEFs. Knocking down GCLM in *Pten*^{-/-} MEFs increased the lipid hydroperoxide levels and sensitivity to Erastin-induced ferroptosis ($P < 0.05$). Collectively, PTEN promotes ferroptosis by downregulating GCLM-mediated lipid hydroperoxide scavenge.

Keywords PTEN; GCLM; ferroptosis; glutathione

磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, *PTEN*)是最常见的抑癌基因之一, 研究人员在遗传性和散发性癌症中都经常观察到其功能丧失。PTEN控制多种生物学过程, 包括维持基因组的稳定性, 细胞的存活、迁移、增殖和代谢^[1], 其水平和活性的细微下降都会导致癌症易感性, 并有利于肿瘤的进展。

铁死亡是近年来发现的一种新型细胞死亡, 在细胞死亡过程中通常伴有大量的铁积累和脂质过氧化^[2]。脂质过氧化物累积主要通过非酶途径和酶途径两种方式介导: 非酶途径是通过铁与过氧化氢反应产生大量毒性自由基, 使细胞膜的磷脂氧化生成脂质过氧化物(phospholipid hydroperoxides, PLOOH); 酶途径则是通过脂加氧酶(lipoxygenase, LOX)和细胞色素P450氧化还原酶(cytochrome p450 oxidoreductase, POR)直接氧化细胞膜的磷脂生成PLOOH。PLOOH继续与细胞内的自由基和铁发生链式反应, 产生更多的PLOOH, 最终导致细胞膜的崩解和细胞死亡^[3]。最近的研究表明, 铁死亡与许多疾病(如肿瘤^[4]、神经系统疾病^[5]、缺血再灌注损伤^[6]、肾损伤^[7]和血液疾病等^[5])的病理生理过程密切相关。

但铁死亡发生的具体分子机制以及如何通过调节细胞铁死亡来干预相关疾病的发生和发展仍有待进一步探索。探究PTEN与铁死亡的关系或许能为癌症等疾病的治疗提供新思路。本研究重点探讨PTEN在铁死亡过程中的作用及其潜在的分子机制, 为肿瘤治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 PTEN缺失小鼠胚胎成纤维细胞系(*Pten*^{-/-})与其对照野生型细胞系(*Pten*^{+/+})是由本实验室保存的^[8]。

1.1.2 实验动物 *PR-cre*工具小鼠购自赛业生物科技公司; *Pten*^{flax/flax}小鼠购自南京模式生物研究所,

均为SPF级别, 动物实验均符合“国际实验动物应用和管理条例”的规定和伦理要求(审批编号: ACUC-A02-2014-003)。

1.1.3 主要试剂 胰蛋白酶、胎牛血清和DMEM培养基购自Hyclone公司; siRNA-NC和siRNA-Gclm购自Sigma-Aldrich公司; Vinculin和GCLM抗体购自Abclonal公司; β -actin抗体购自Santa Cruz公司; PTEN、p-AKT^{S473}和AKT抗体购自Cell Signaling Technology公司; 抗兔和鼠的荧光二抗购自LI-COR公司; CCK-8试剂盒购自北京易盛生物医药科技公司; LipofectamineTM RNA iMax, 脂质过氧化物(lipid ROS)检测试剂盒购自Invitrogen公司; 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购自Roche公司; 丁硫氨酸亚砷亚胺[L-buthionine (S,R)-sulfoximine, BSO]购自上海陶术生物科技有限公司; 抗氧化剂N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、坏死性凋亡抑制剂(necrostatin-1, Nec-1)、caspase抑制剂(Z-VAD-FMK)和自噬抑制剂(3-methyladenine, 3MA)购自Selleck公司; 铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1, Fer-1)购自Sigma公司; Trizol试剂购自Life Technologies公司; PI染色试剂盒、反转录试剂盒购自翊圣生物技术有限公司; 荧光定量PCR试剂盒购自abm公司; 组织细胞谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒购自普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CPTAC数据库分析 使用cBioPortal网站(<http://www.cbioportal.org>)分析人胶质母细胞瘤和子宫内膜癌中的基因表达情况。

1.2.2 细胞培养及转染 细胞培养于DMEM培养基(含10%血清和1%青霉素链霉素双抗), 并将其置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。根据转染质粒的不同, 分为阴性对照组(siRNA-NC)、siRNA-Gclm-1组和siRNA-Gclm-2组, 转染用量为5 μ g, 按照LipofectamineTM RNA iMax转染说明书进行, 分别于转染48 h后收集细胞。

1.2.3 CCK-8分析细胞活力 将细胞接种于96孔板,每孔接种4 000个细胞,每组设5个复孔,待细胞贴壁时每孔加入药物处理,一定时间后,加入CCK-8,3 h后检测各孔在450 nm波长的吸光度(D)值,以不加药组的 D 值校正,用GraphPad Prism 8分析评估细胞活力。

1.2.4 细胞死亡检测 将细胞接种于12孔板中,待细胞贴壁后,加Erastin(2 $\mu\text{mol/L}$)或同体积的DMSO处理,10 h后消化收集细胞于1.5 mL EP管中,加入PBS清洗,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$,离心5 min,吸走上清,每管中加入100 μL 流式细胞染色缓冲液和10 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI)重悬细胞,室温避光孵育15~20 min,通过C6流式细胞仪FL3通道,用FlowJo软件进行数据分析,PI染色阳性为死细胞。

1.2.5 蛋白质提取和蛋白质免疫印迹实验 不同处理的细胞,加入含适量溴酚蓝的蛋白裂解液,提取蛋白,SDS-PAGE跑胶,转膜和封闭,加相应的一抗(1:1 000稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加TBS清洗三遍,第二天加相应二抗(1:10 000稀释),室温孵育2 h, TBS清洗三遍,在OdysseyCLX双色红外激光成像系统中显影,并获取图像。

1.2.6 流式细胞仪检测脂质过氧化水平 预热PBS、HBSS,用PBS清洗细胞,加HBSS和探针(比例1:1 000)避光室温孵育30 min,吸走探针,PBS清洗细胞两遍,将细胞消化收集到1.5 mL EP管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$ 离心5 min,去除上清,200 μL PBS重悬,避光,通过C6流式细胞仪检测FITC荧光值,用FlowJo软件进行数据分析。

1.2.7 细胞谷胱甘肽(GSH)检测 利用普利莱组织细胞谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒,首先将细胞接种于6孔板中,待细胞长满收集新鲜细胞 2×10^6 个,PBS清洗离心收集细胞,吸尽上清。加入200 μL 的预冷的组织细胞裂解液,超声裂解细胞。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心10 min。取上清和蛋白沉淀试剂S溶液1:1混合并涡旋。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 离心10 min,取上清用于谷胱甘肽测定。按照试剂盒说明制备GSH标准品,在96孔板中加入GSH标准品和样品,以及各类工作液,30 min后测定吸光度(D_{450})值,利用GSH标准品浓度为横坐标, D_{450} 为纵坐标制作标准曲线。根据标准曲线计算样品GSH浓度。

1.2.8 RT-qPCR检测Gclm mRNA的表达 Trizol提取总RNA,转录试剂盒反转录为cDNA。按试剂盒

进行PCR,以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算Gclm的相对表达量。Gclm引物序列如下:上游引物序列5'-AGG AGC TTC GGG ACT GTA TCC-3',下游引物序列5'-GGG ACA TGG TGC ATT CCA AAA-3'。

1.3 统计学分析

使用Graphpad Prism 8统计软件,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,多组的组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

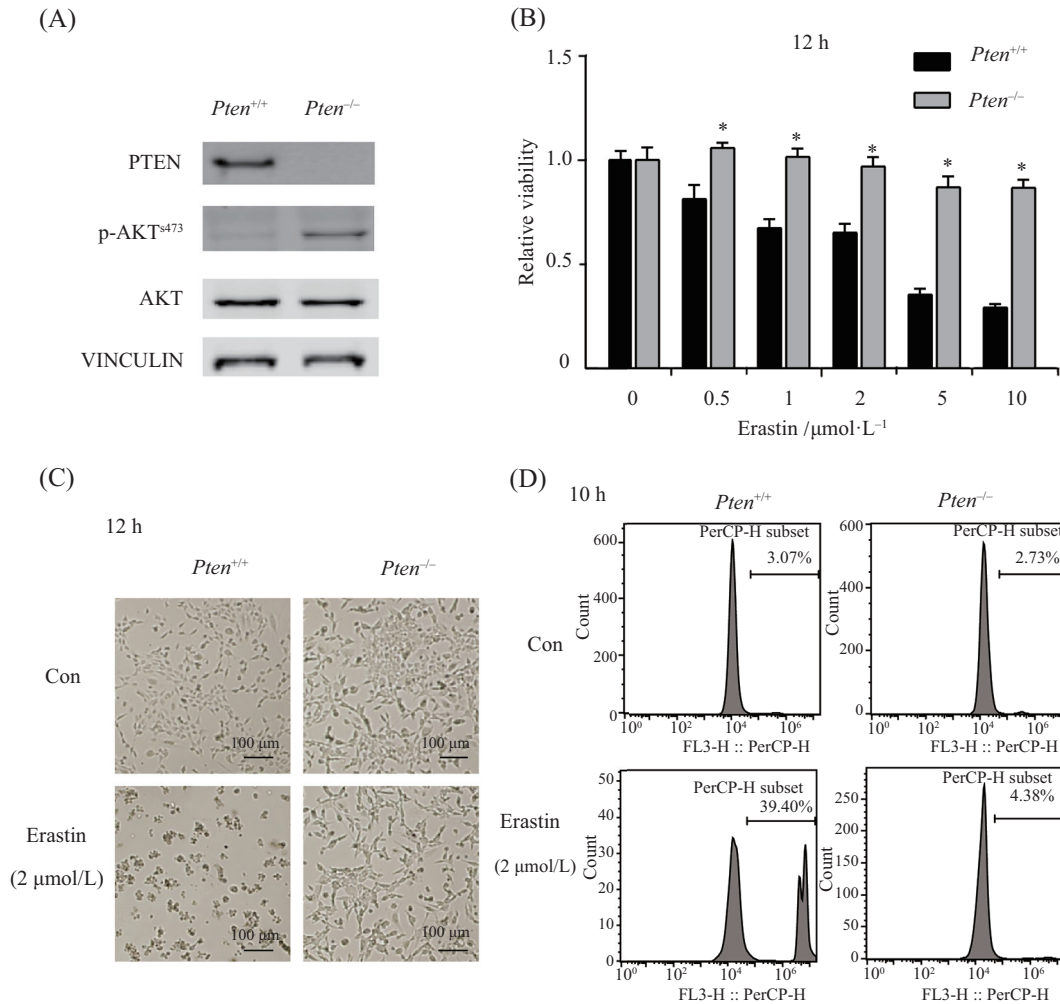
2 结果

2.1 PTEN缺失降低细胞对Erastin的敏感性

Western blot结果显示,与 $Pten^{+/+}$ 细胞相比, $Pten^{-/-}$ 细胞中PTEN表达缺失,p-AKT^{S473}表达水平升高(图1A)。接下来我们利用这对细胞进行后续实验,探讨PTEN与铁死亡之间的关系。首先用浓度为0、0.5、1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的铁死亡诱导剂Erastin处理小鼠胚胎成纤维细胞系(MEFs),12 h后用CCK-8法检测细胞活力,与对照组相比, $Pten^{-/-}$ 细胞对Erastin诱导的细胞死亡敏感性减弱($P < 0.05$)(图1B)。2 $\mu\text{mol/L}$ Erastin处理 $Pten^{+/+}$ 和 $Pten^{-/-}$ 细胞12 h后,通过显微镜观察细胞形态发现, $Pten^{+/+}$ 细胞发生皱缩,已不具备完整的细胞形态,漂浮在培养基中,而 $Pten^{-/-}$ 细胞基本无形态改变(图1C)。同时,2 $\mu\text{mol/L}$ Erastin处理 $Pten^{+/+}$ 和 $Pten^{-/-}$ 细胞10 h后,PI染色检测细胞死亡,结果显示 $Pten^{+/+}$ 细胞发生明显细胞死亡,而 $Pten^{-/-}$ 细胞未发生明显细胞死亡(图1D)。

2.2 铁死亡抑制剂能逆转Erastin引起的细胞死亡

为了验证Erastin诱导的细胞死亡是否为铁死亡,我们在Erastin(2 $\mu\text{mol/L}$)处理的同时加入铁死亡抑制剂Fer-1(10 $\mu\text{mol/L}$)、抗氧化剂NAC(1 mmol/L)、坏死性凋亡抑制剂Nec-1(2 $\mu\text{g/mL}$)、凋亡抑制剂Z-VAD-FMK(10 $\mu\text{g/mL}$)和自噬抑制剂3MA(5 mmol/L),12 h后用显微镜观察细胞形态,发现只有抗氧化剂NAC和铁死亡抑制剂Fer-1能逆转 $Pten^{+/+}$ 细胞中Erastin引起的细胞损伤,其他形式的细胞死亡抑制剂均不能逆转(图2A)。同时CCK-8法检测细胞活力,发现只有抗氧化剂NAC和铁死亡抑制剂Fer-1能逆转 $Pten^{+/+}$ 细胞中Erastin引起的细胞死亡($P < 0.05$),而其他形式的细胞死亡抑制剂均不能完全逆转(图2B)。这些结果表明Erastin诱导的细胞死亡是铁死亡,PTEN缺失能抑制铁死亡发生。



A: 通过蛋白质印迹检测 *Pten*^{+/+} 和 *Pten*^{-/-} MEFs 中 PTEN、p-AKT^{S473} 和 AKT 表达水平; B: CCK-8 法检测 Erastin 对 *Pten*^{+/+} 和 *Pten*^{-/-} MEFs 细胞活力的影响; C: 显微镜观察 Erastin 对细胞形态的影响; D: PI 染色检测细胞死亡; **P* < 0.05, 与 *Pten*^{+/+} MEF 组相比。

A: Western blot was used to analyze PTEN, p-AKT^{S473} and AKT expression levels in *Pten*^{+/+} and *Pten*^{-/-} MEFs; B: cell viability was investigated in *Pten*^{+/+} and *Pten*^{-/-} MEFs treated with Erastin; C: effect of Erastin on cell morphology; D: gating strategies for PI staining analysis through flow cytometry. **P* < 0.05 compared with *Pten*^{+/+} MEFs group.

图1 *PTEN* 缺失降低细胞对 Erastin 的敏感性

Fig.1 *PTEN*-deficiency decreased the sensitivity of cells to Erastin

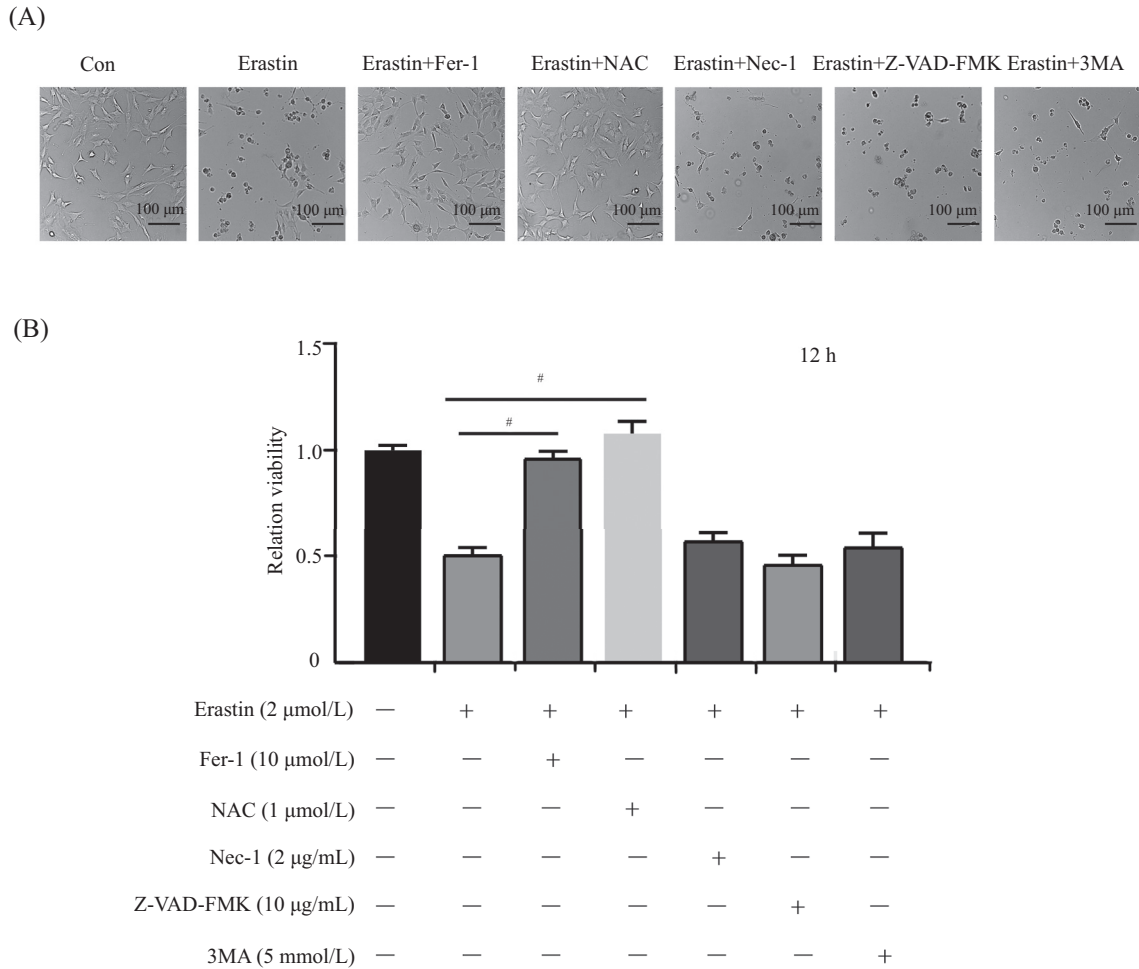
2.3 *PTEN* 缺失降低 Erastin 引起的脂质过氧化物累积

脂质过氧化物累积是铁死亡发生的关键, 为了进一步研究 *PTEN* 缺失抑制铁死亡的原因, 我们检测了 *Pten*^{-/-} 细胞和 *Pten*^{+/+} 细胞中脂质过氧化物水平。流式细胞术结果如图3所示, *Pten*^{-/-} 和 *Pten*^{+/+} 细胞中本底脂质过氧化物水平无明显差异; 2 μmol/L Erastin 处理 12 h 后, *Pten*^{-/-} 细胞中脂质过氧化 (lipid hydroperoxide, lipid ROS) 水平明显低于 *Pten*^{+/+} 细胞 (图3A 和图3B)。GSH 是哺乳动物细胞中的主要抗氧化剂, 也是谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的首选底物。GPX4 能降解小分子过氧化物

和某些脂质过氧化物, 抑制脂质过氧化水平, 从而抑制铁死亡发生。试剂盒检测 *Pten*^{-/-} 细胞和 *Pten*^{+/+} 细胞中 GSH 水平, 结果显示 *Pten*^{-/-} 细胞中 GSH 水平明显高于 *Pten*^{+/+} 细胞 (图3C) (*P* < 0.05)。

2.4 *PTEN* 抑制 GCLM 的表达

GCLM 和 GCLC 编码的谷氨酸-半胱氨酸连接酶可以将谷氨酸和胱氨酸转化为 GSH, 通过促进 GSH 合成抑制铁死亡。首先在 CPTAC 数据库中分析 *PTEN* 与 GCLM 表达相关性, 在胶质母细胞瘤和子宫内膜癌中 *PTEN* 与 GCLM 表达呈负相关 (图4A 和图4B)。接下来我们用 RT-qPCR 方法检测 *Pten*^{-/-} 细胞和 *Pten*^{+/+} 细胞中 *Gclm* mRNA 表达水平, 用



A: Erastin联合不同细胞死亡抑制剤对 $Pten^{+/+}$ 细胞形态的影响; B: CCK-8法检测Erastin联合不同细胞死亡抑制剤对 $Pten^{+/+}$ 细胞增殖的影响; $^{\#}P<0.05$, 与Erastin处理的 $Pten^{+/+}$ 细胞相比。

A: effects of Erastin combing with different cell death inhibitors on morphology of $Pten^{+/+}$ cells; B: CCK-8 detection of the effects of Erastin combing with different cell death inhibitors on the proliferation of $Pten^{+/+}$ cells; $^{\#}P<0.05$ compared with $Pten^{+/+}$ cells treated with Erastin group.

图2 铁死亡抑制剤能逆转Erastin引起的细胞死亡

Fig.2 Eastin-induced cell death could be reversed by ferroptosis inhibitors

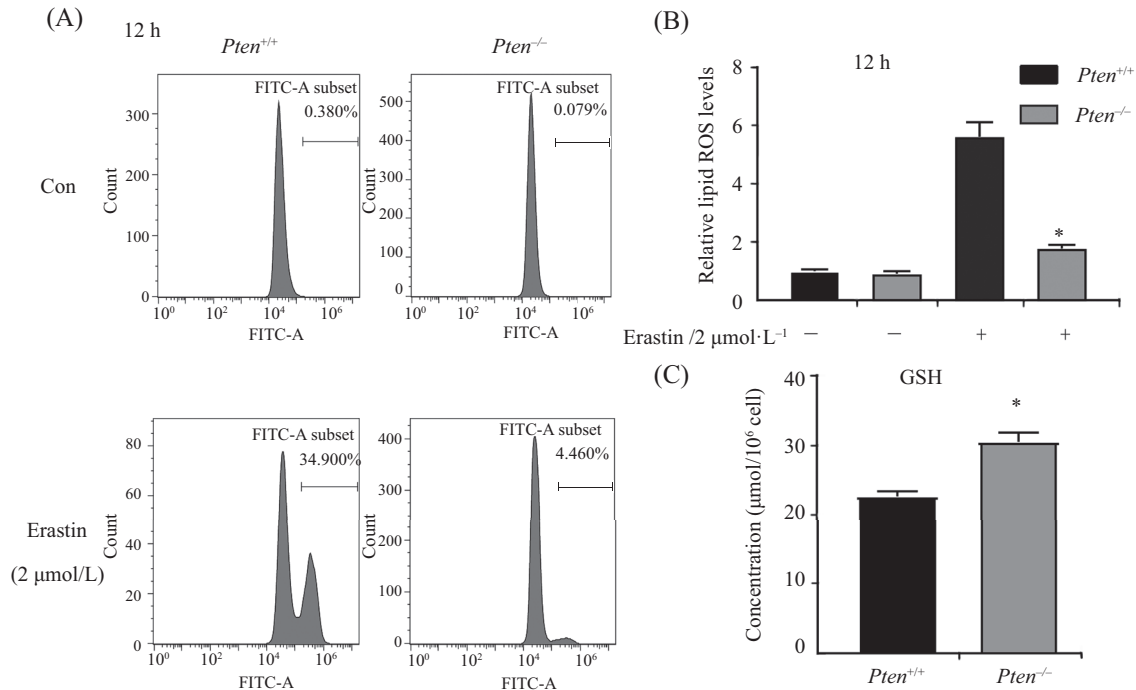
Western blot方法检测 $Pten^{-/-}$ 细胞和 $Pten^{+/+}$ 细胞中GCLM蛋白表达水平, 结果显示, 与 $Pten^{+/+}$ 细胞相比, $Pten^{-/-}$ 细胞中Gclm mRNA和蛋白水平明显上升($P<0.05$)(图4C和图4D), 另外PTEN缺失的小鼠子宫内膜癌样品中GCLM蛋白表达水平明显上升($P<0.05$)(图4E)。

2.5 敲低GCLM增强 $Pten$ 缺失细胞对Erastin的敏感性

在 $Pten^{-/-}$ 细胞中转染siRNA-NC、siRNA-Gclm-1和siRNA-Gclm-2。Western blot方法检测敲低组细胞 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-1、 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-2与对照组细胞 $Pten^{-/-}$ -NC中GCLM蛋白表达情况, 结果显示, 敲低组细胞 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-1、 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-2中GCLM蛋白表达水平明显低于降低对照组细胞

$Pten^{-/-}$ -NC(图5A), 说明siRNA敲低效果较好可以用于后续实验。

用2 μmol/L和10 μmol/L Erastin处理 $Pten^{-/-}$ -NC、 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-1和 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-2细胞, 与对照组细胞 $Pten^{-/-}$ -NC相比, 敲低组细胞 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-1和 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-2对Erastin的敏感性增强, 在Erastin浓度为2 μmol/L时差异更明显($P<0.05$)(图5B)。流式细胞术检测Erastin(2 μmol/L)处理12 h后, $Pten^{-/-}$ -NC、 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-1和 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-2细胞中脂质过氧化物水平, 结果显示, 敲低组细胞 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-1和 $Pten^{-/-}$ -si-Gclm-2中脂质过氧化物水平明显高于对照组细胞($P<0.05$)(图5C)。GCLM抑制剤丁硫氨酸亚砷亚胺(BSO), 可显著降低细胞内GSH水平。用2 μmol/L Erastin处理 $Pten^{-/-}$ 细胞的同时加入50 μmol/L



A, B: 流式细胞术分析Erastin处理后*Pten*^{+/+}和*Pten*^{-/-} MEFs中的脂质过氧化(lipid ROS)水平; C: *Pten*^{+/+}和*Pten*^{-/-} MEFs中的GSH水平; **P*<0.05, 与*Pten*^{+/+} MEFs组相比。

A,B: flow cytometric analysis of Lipid ROS levels in treated *Pten*^{+/+} and *Pten*^{-/-} MEFs with Erastin; C: bar graph showing intracellular GSH levels in *Pten*^{+/+} and *Pten*^{-/-} MEFs; **P*<0.05 compared with *Pten*^{+/+} MEFs group.

图3 *PTEN*缺失导致脂质过氧化物水平降低

Fig.3 *PTEN*-deficiency decreased lipid ROS level

BSO, 12 h后采用CCK-8法检测细胞活力, 结果显示BSO能显著增强*Pten*^{-/-}细胞对Erastin的敏感性(*P*<0.05)(图5D)。

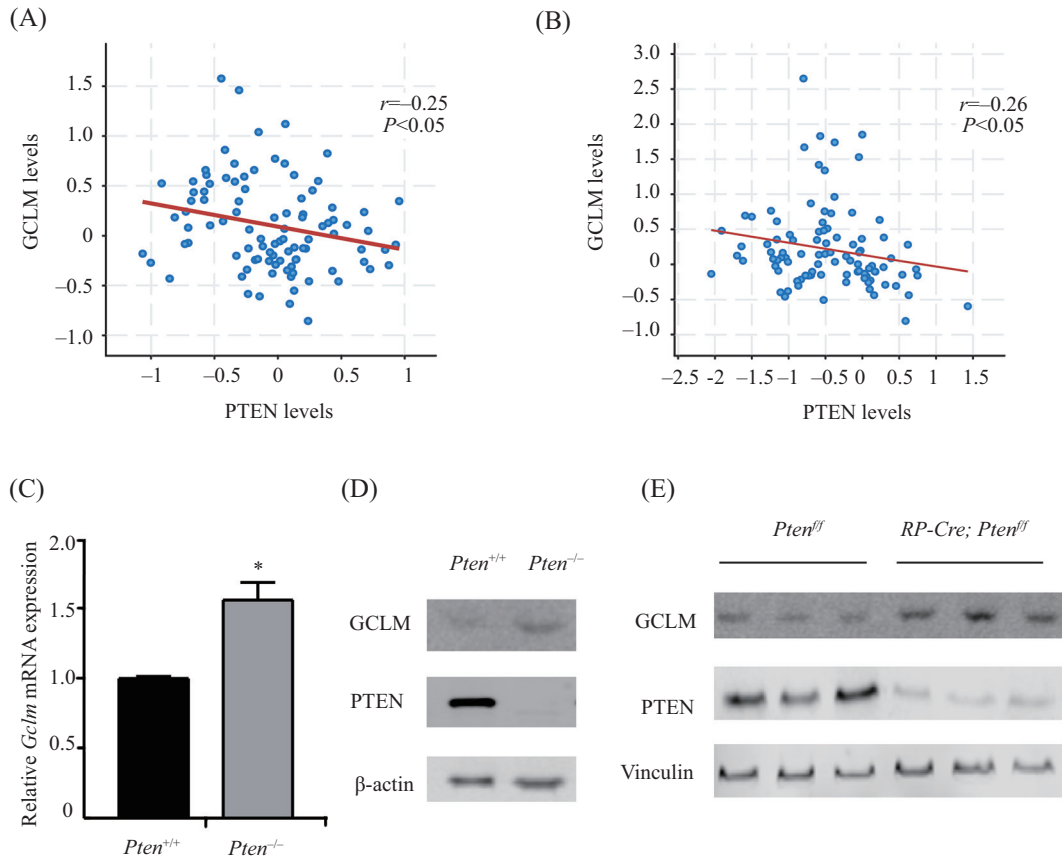
3 讨论

*PTEN*是人类癌症中最常发生突变的肿瘤抑制基因之一, *PTEN*缺失突变会导致肿瘤发生、心肌损伤、动脉硬化等^[1]。尽管近几年来*PTEN*的功能和作用得到不断完善, 但其在临床治疗和药物转化方面的运用仍有局限。深入地研究*PTEN*在疾病发生发展中的作用及分子机制, 对寻求其潜在的治疗靶点至关重要。

铁死亡是一种铁依赖的脂质过氧化物积累的程序性细胞死亡形式^[2]。铁死亡的起始和执行与氨基酸、脂质和铁代谢调节都有联系, 受到多种分子机制的调控, 大致可分为几类: (1) GSH和氧化还原稳态调节相关, 如胱氨酸/谷氨酸反向转运系统^[9]、GPX4的调节^[10]、NRF2和p53调节轴^[11]等; (2) 铁稳态调节相关, 如ATG5-ATGA7-NCOA4铁自噬调节蛋白途径^[12]、铁反应元件结合蛋白调节系统^[13];

(3) 糖类和脂类代谢的相关酶, 如6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)^[14]、长链脂酰辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)^[15]和溶血卵磷脂酰基转移酶(recombinant lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3)^[16]等。虽然铁死亡在生理条件下受到严格调节, 但其失调与多种病理状况和疾病有关。铁死亡可加速许多常见的人类退行性疾病, 如帕金森氏病和亨廷顿氏病^[17]。在肝癌、前列腺癌和乳腺癌中, 铁死亡能抑制肿瘤细胞增殖^[18-19], 并且铁死亡的激活有助于各种癌症治疗, 如免疫检查点阻断^[20]和放射治疗^[21]。

*PTEN*作为最常发生突变的肿瘤抑制基因之一, 虽有研究表明, PI3K-AKT-mTORC1信号通路的持续激活通过上调下游固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)介导的脂肪生成使癌细胞能够抵抗铁死亡^[22]。此外, ZHANG等^[23]发现(半)胱氨酸激活mTORC1, 并部分通过Rag-mTORC1-4EBP信号转导轴促进GPX4蛋白合成。但*PTEN*在铁死亡过程



A、B: 在CPTAC数据库中分析PTEN与GCLM表达相关性(人胶质母细胞瘤中样本量 $n=99$, 人子宫内膜样本量中 $n=81$); C、D: 荧光定量PCR和蛋白质印迹法检测 $Pten^{+/+}$ 和 $Pten^{-/-}$ MEFs中Gclm mRNA和蛋白质表达水平; E: 蛋白质印迹法检测PTEN缺失的小鼠子宫内膜癌组织中PTEN和GCLM蛋白表达水平; * $P<0.05$, 与 $Pten^{+/+}$ MEF组相比。

A,B: Spearman's correlation analysis on the correlation between PTEN and GCLM according to the CPTAC database ($n=99$ in Glioblastoma, $n=81$ in Endometrial Carcinoma); C,D: expression of Gclm mRNA and protein in $Pten^{+/+}$ and $Pten^{-/-}$ MEFs detected by fluorescence quantitative PCR and Western blot; E: expression of PTEN and GCLM protein in PTEN-deficient mouse endometrial cancer tissue detected by Western blot; * $P<0.05$ compared with $Pten^{+/+}$ MEFs group.

图4 PTEN抑制GCLM表达

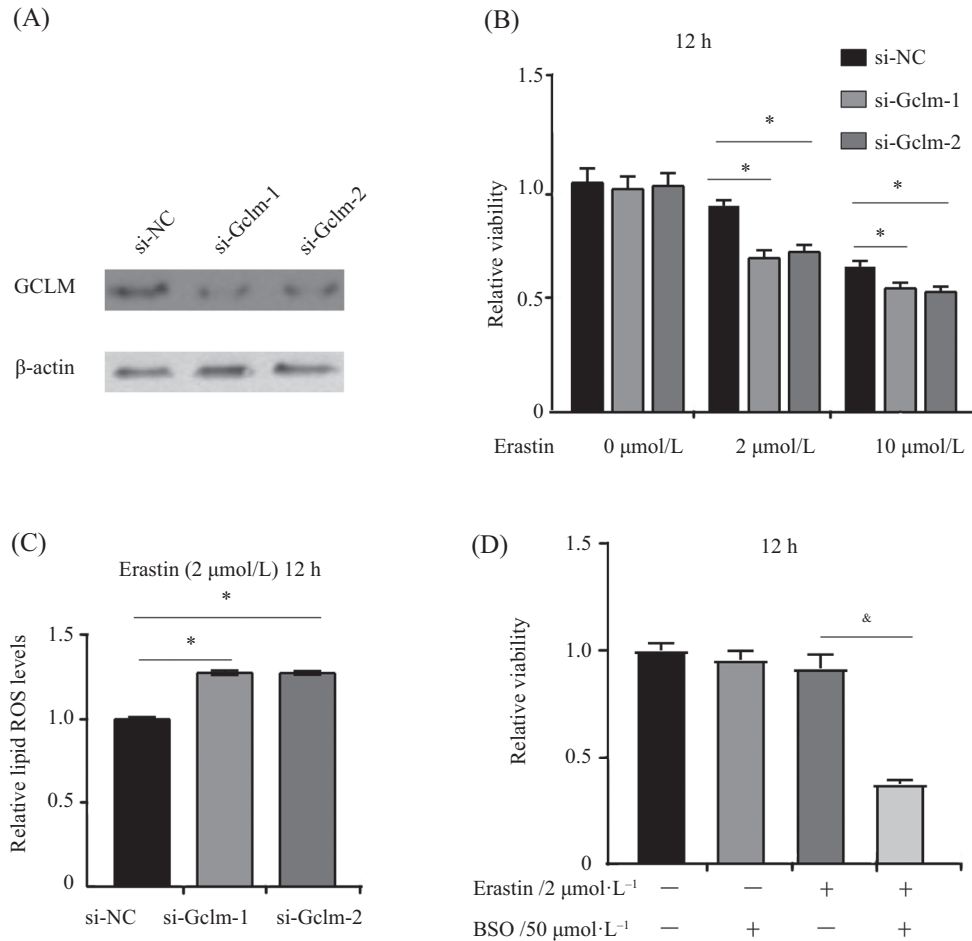
Fig.4 PTEN inhibited GCLM expression

中的作用仍未完全清楚。本研究结果表明, PTEN缺失的小鼠胚胎成纤维细胞对Erastin诱导的铁死亡敏感性降低。在Erastin处理的同时加入其他细胞死亡抑制剂, 发现只有铁死亡抑制剂和抗氧化剂能够逆转Erastin诱导的细胞死亡。我们检测铁死亡指标——脂质过氧化水平, 发现Erastin处理后, 与对照组相比 $Pten^{-/-}$ 细胞中脂质过氧化水平明显降低。这些结果表明PTEN缺失能降低细胞对铁死亡的敏感性, 也可以说PTEN在铁死亡中起到促进作用, PTEN缺失的肿瘤细胞生长增殖迅速的原因可能是具有抵抗铁死亡的能力。

GSH是铁死亡的关键调节因子^[24], 是细胞中最丰富的抗氧化分子, 来源于半胱氨酸和谷氨酸盐, 可以通过谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,

GPX)和谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)介导的反应消除ROS^[24], 同时它也是GPX4的首选底物, GPX4通过降解小分子过氧化物和某些脂质过氧化物抑制铁死亡发生^[25]。GCLM和GCLC编码的谷氨酸-半胱氨酸连接酶可以将谷氨酸和胱氨酸转化为GSH^[26], 通过促进GSH合成抑制铁死亡^[27]。本研究表明, PTEN缺失上调GCLM的表达, 因此, PTEN可能通过抑制GCLM的表达来促进铁死亡的发生。在 $Pten^{-/-}$ 细胞中敲除GCLM或使用GCLM抑制剂能增加细胞对Erastin的敏感性和脂质过氧化水平, 进一步验证了我们的猜想。

综上所述, PTEN能通过抑制GCLM表达来升高脂质过氧化水平进而促进铁死亡发生。这提示肿瘤细胞中PTEN缺失会抑制铁死亡导致肿瘤细胞迅速



A: 蛋白质印迹分析GCLM敲低的 $Pten^{-/-}$ 细胞与对照组中GCLM表达水平; B: CCK-8检测Erastin对 GCLM敲低的 $Pten^{-/-}$ 细胞与对照组中细胞活力的影响; C: 流式细胞术分析Erastin处理后GCLM敲低的 $Pten^{-/-}$ 细胞与对照组中的脂质过氧化(lipid ROS)水平; D: CCK-8法检测Erastin联合BSO对 $Pten^{-/-}$ 细胞增殖的影响; * $P < 0.05$, 与siNC- $Pten^{-/-}$ 细胞组相比; & $P < 0.05$, 与Erastin处理的 $Pten^{-/-}$ 细胞组相比。

A: Western blot was used to analyze GCLM expression levels in GCLM-deficient $Pten^{-/-}$ cells and control cells; B: CCK-8 assay was used to detect the inhibitory rate of si-Gclm- $Pten^{-/-}$ and control cells treated with different concentrations of Erastin; C: flow cytometric analysis of Lipid ROS level in treated siGclm- $Pten^{-/-}$ and control cells with Erastin; D: CCK-8 detection of the effects of Erastin and BSO on the proliferation of $Pten^{-/-}$ cells; * $P < 0.05$ compared with siNC- $Pten^{-/-}$ cells group; & $P < 0.05$ compared with $Pten^{-/-}$ cells treated with Erastin group.

图5 敲低GCLM增强 $Pten^{-/-}$ 细胞对Erastin的敏感性

Fig.5 Knocking down GCLM enhanced the sensitivity of $Pten^{-/-}$ cells to Erastin

增殖,这也是对PTEN作为抑癌基因的机制补充。在临床治疗PTEN缺失肿瘤时可以以此为靶点,利用GCLM相关抑制剂,通过促进铁死亡发生,达到治疗肿瘤的目的。

参考文献 (References)

- [1] SHI Y, PALUCH B E, WANG X, et al. PTEN at a glance [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 20): 4687-92.
- [2] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-72.
- [3] LEI G, ZHUANG L, GAN B. mTORC1 and ferroptosis: regulatory mechanisms and therapeutic potential [J]. Bioessays, 2021, 43(8): e2100093.
- [4] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. Cell, 2014, 156(1/2): 317-31.
- [5] DI D F, TRAMUTOLA A, BUTTERFIELD D A. Role of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in the pathogenesis of alzheimer disease and other selected age-related neurodegenerative disorders [J]. Free Radic Biol Med, 2017, 111: 253-61.
- [6] LI Y, FENG D, WANG Z, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion [J]. Cell Death Differ, 2019, 26(11): 2284-99.
- [7] WANG Y, QUAN F, CAO Q, et al. Quercetin alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis [J]. J Adv Res, 2021, 28: 231-43.
- [8] LI C, CHEN H, LAN Z, et al. mTOR-dependent upregulation of xCT blocks melanin synthesis and promotes tumorigenesis [J].

- Cell Death Differ, 2019, 26(10): 2015-28.
- [9] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620.
- [10] SEIBT T M, PRONETH B, CONRAD M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 144-52.
- [11] CHEN D, TAVANA O, CHU B, et al. NRF2 is a major target of ARF in p53-independent tumor suppression [J]. Mol Cell, 2017, 68(1): 224-32.e4.
- [12] GAO M, MONIAN P, PAN Q, et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process [J]. Cell Res, 2016, 26(9): 1021-32.
- [13] YAO F, CUI X, ZHANG Y, et al. Iron regulatory protein 1 promotes ferroptosis by sustaining cellular iron homeostasis in melanoma [J]. Oncol Lett, 2021, 22(3): 657.
- [14] CAO F, LUO A, YANG C. G6PD inhibits ferroptosis in hepatocellular carcinoma by targeting cytochrome P450 oxidoreductase [J]. Cell Signal, 2021, 87: 110098.
- [15] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(1): 91-8.
- [16] LEE J Y, KIM W K, BAE K H, et al. Lipid metabolism and ferroptosis [J]. Biology, 2021, doi: 10.3390/biology10030184.
- [17] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. Nature, 2015, 520(7545): 57-62.
- [18] SUN X, OU Z, CHEN R, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. Hepatology, 2016, 63(1): 173-84.
- [19] LI M, CHEN X, WANG X, et al. RSL3 enhances the antitumor effect of cisplatin on prostate cancer cells via causing glycolysis dysfunction [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 192: 114741.
- [20] LANG X, GREEN M D, WANG W, et al. Radiotherapy and immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of SLC7A11 [J]. Cancer Discov, 2019, 9(12): 1673-85.
- [21] YE L F, CHAUDHARY K R, ZANDKARIMI F, et al. Radiation-induced lipid peroxidation triggers ferroptosis and synergizes with ferroptosis inducers [J]. ACS Chem Biol, 2020, 15(2): 469-84.
- [22] YI J, ZHU J, WU J, et al. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(49): 31189-97.
- [23] ZHANG Y, SWANDA R V, NIE L, et al. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1589.
- [24] HU J, WANG T, ZHOU L, et al. A ROS responsive nanomedicine with enhanced photodynamic therapy via dual mechanisms: GSH depletion and biosynthesis inhibition [J]. J Photochem Photobiol B, 2020, 209: 111955.
- [25] MAIORINO M, CONRAD M, URSINI F. GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues [J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(1): 61-74.
- [26] LU S C. Regulation of glutathione synthesis [J]. Mol Aspects Med, 2009, 30(1/2): 42-59.
- [27] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-85.