

褪黑素通过下调 SLC7A11 表达来诱导胶质瘤细胞 SH-SY5Y 铁死亡的机制研究

宋志远 武一平 杨华 孙艳艳 曲大成 任洪波

【摘要】 目的 探讨褪黑素(Melatonin, MT)通过下调溶质载体家族 7 成员 11(Solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)表达对胶质瘤细胞(Glioma cell, SH-SY5Y)铁死亡的影响。**方法** 使用不同水平的 MT 处理人胶质瘤 SH-SY5Y 细胞,采用细胞计数试剂盒-8(Cell counting kit-8, CCK-8)法检测细胞活性,进而选择合适的 MT 水平;实验分组为二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)组(加入常规培养基)、MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT)、凋亡抑制剂氟甲基酮(Z-VAD-FMK) + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 20 μ mol/L 的凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK)、坏死性凋亡抑制剂 Necrosulfonamide(Nec-1) + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 1 μ mol/L 的坏死性凋亡抑制剂 Nec-1)、自噬抑制剂 Chloroquine + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 5 mmol/L 的自噬抑制剂 Chloroquine)、特异性铁死亡抑制剂 Deferoxamine(DFO)对照组(加入 20 μ mol/L 的特异性铁死亡抑制剂 DFO)及 DFO + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 20 μ mol/L DFO);CCK-8 法检测细胞活性;碘化丙啶(Propidium iodide, PI)染色法评价细胞死亡情况;Phen Green SK 荧光指示剂法测定细胞 Fe^{2+} 水平;活性氧(Reactive oxygen, ROS)检测试剂盒测定细胞总 ROS 水平;C11-BODIPY 染色法检测细胞脂质活性氧(Lipid reactive oxygen species, lipid ROS)水平;总谷胱甘肽(Glutathione, GSH)检测试剂盒测定细胞 GSH 水平;Western blot 法检测细胞铁蛋白重链(Ferritin heavy polypeptide, FTH)、铁蛋白轻链(Ferritin light chain, FTL)、膜铁转运蛋白(Ferroportin, FPN)、转铁蛋白受体 1(Transferrin receptor 1, TFR1)和 SLC7A11 蛋白表达水平;实时定量反转录聚合酶链反应(Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测细胞 SLC7A11 mRNA 表达水平。**结果** 随着 MT 水平的增高,SH-SY5Y 细胞活性逐渐降低($P < 0.05$),由于 1 mmol/L 处理的 SH-SY5Y 细胞活性最低,因此选择 1 mmol/L MT 诱导细胞。与 DMSO 组比较,DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞活性显著升高($P < 0.05$),而 Z-VAD-FMK + MT 组、Nec-1 + MT 组和 Chloroquine + MT 组 SH-SY5Y 细胞活性无明显差异($P > 0.05$)。此外,MT 能显著提高 SH-SY5Y 细胞中 Fe^{2+} 水平、ROS 和 lipid ROS 水平以及 TFR1 蛋白表达水平,降低 GSH 水平和 FPN1, FTH, FTL 蛋白及 SLC7A11 基因表达水平,促进细胞铁死亡($P < 0.05$),而 DFO 则能逆转 MT 对上述指标水平的影响($P < 0.05$),但 DFO 本身对上述指标水平无明显影响($P > 0.05$)。**结论** MT 可能通过下调 SLC7A11 表达来提高细胞内 Fe^{2+} 水平,进而诱导胶质瘤细胞铁死亡。

【关键词】 褪黑素 溶质载体家族 7 成员 11 胶质瘤 铁死亡

【中图分类号】 R739.41 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)05-0416-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.05.004

Study on the mechanism of melatonin inducing iron death of SH-SY5Y glioma cells by down-regulating the expression of SLC7A11 Song Zhiyuan, Wu Yiping, Yang Hua, et al. Department of Neurosurgery, Handan Central Hospital, Handan 056001

【Abstract】 Objective To investigate the effect of melatonin (MT) on the iron death of SH-SY5Y glioma cells by down-regulating the expression of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11). **Methods** Different concentrations of MT were used to treat human glioma SH-SY5Y cells, and the CCK-8 method was used to detect cell viability to select the appropriate MT concentration. The experimental groups were: DMSO group (added conventional medium), MT group (added 1 mmol/L MT), Z-VAD-FMK + MT group (added 1 mmol/L MT and 20 μ mol/L apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK), Nec-1 + MT group (added 1 mmol/L MT and 1 μ mol/L necroptosis inhibitor Nec-1), chloroquine + MT group (added 1 mmol/L MT and 5 mmol/L autophagy

inhibitor chloroquine), DFO control group (added 20 $\mu\text{mol/L}$ specific iron death inhibitor DFO), and DFO + MT group (added 1 mmol/L MT and 20 $\mu\text{mol/L}$ DFO). CCK-8 method was used to detect cell viability; propidium iodide (PI) staining method was used to evaluate cell death; Phen Green SK fluorescent indicator method was used to measure the level of cell Fe^{2+} ; reactive oxygen species (ROS) detection kit was used to measure the total level of ROS; C11-BODIPY staining method was used to detect the level of lipid ROS (lipid ROS); the total glutathione (GSH) detection kit was used to measure the level of cellular GSH; Western blot method was used to detect the expression levels of cell ferritin heavy polypeptide (FTH), ferritin light chain (FTL), ferroportin (FPN), transferrin receptor 1 (TFR1) and SLC7A11 proteins; qRT-PCR was used to detect the expression level of SLC7A11 mRNA in the cells. **Results** With the increase of MT concentration, the activity of SH-SY5Y cells gradually decreased ($P < 0.05$), since the activity of SH-SY5Y cells treated with 1 mmol/L was the lowest, 1 mmol/L MT was selected to induce cells. Compared with DMSO group, SH-SY5Y cell activity in DFO + MT group was significantly increased ($P < 0.05$), while SH-SY5Y cell activity was different in Z-VAD-FMK + MT group, Nec-1 + MT group and chloroquine + MT group was not statistically significantly different ($P > 0.05$). In addition, MT could significantly increase Fe^{2+} level, ROS and lipid ROS levels, and TFR1 protein expression in SH-SY5Y cells, reduce GSH level and FPN1, FTH, FTL proteins and SLC7A11 gene expression, and promote cell iron death ($P < 0.05$), while DFO can reverse the effects of MT on the above indicators ($P < 0.05$), but DFO itself had no significant effect on the above indicators ($P > 0.05$). **Conclusion** MT may reduce the expression of SLC7A11 and increase the intracellular Fe^{2+} level, thereby inducing iron death of glioma cells.

【Key words】 Melatonin Solute carrier family 7 member 11 Glioma Iron death

胶质瘤是神经系统最常见的恶性肿瘤之一,其侵袭性和复发性较高,临床治疗非常困难。胶质瘤的发展机制复杂,目前并不完全清楚。因此,深入探讨胶质瘤的分子机制意义重大。近年来发现了一种全新的细胞死亡方式,被称为铁死亡,是与凋亡、坏死、自噬不同的依赖铁的脂质活性氧(Lipid reactive oxygen species, lipid ROS)累积过量导致细胞死亡的方式^[1]。铁代谢异常是铁死亡的主要诱因,铁离子水平的异常升高导致铁蛋白重链(FTH)、铁蛋白轻链(FTL)和膜铁转运蛋白(FPN)表达下调,转铁蛋白受体 1(TFR1)表达上调^[2]。一些研究表明,铁死亡在黑色素瘤、急性肺损伤、脂肪性肝病等多种疾病中发挥作用^[3-5]。然而,铁死亡在胶质瘤中研究较少。褪黑素(Melatonin, MT)是一种能够调节生物节律的活性物质,主要由松果体分泌,参与调节体温、免疫反应等生理过程。近年来发现,MT 可单独或者与其它药物联合发挥抑瘤、抗炎等作用,是乳腺癌^[6]、结直肠癌^[7]、非小细胞肺癌^[8]的靶向治疗药物。Gu 等^[9]发现,MT 显著抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭,促进凋亡,其机制与 miR-155 的下调表达有关。但是,目前并不清楚 MT 是否参与调控胶质瘤细胞铁死亡。因此,本研究将探讨 MT 对胶质瘤细胞铁死亡的影响及其作用机制,为靶向治疗胶质瘤提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基购自美国赛默飞世尔公司;MT 购自美国 Sigma 公司;凋亡抑制剂氟甲基酮(Z-VAD-FMK)、坏死性凋亡抑制剂 Necro-sulfonamide(Nec-1)、自噬抑制剂 Chloroquine、特异性铁死亡抑制剂 Deferoxamine(DFO)均购自美国 MedChemExpress 公司;CCK-8 试剂、碘化丙啶(PI)购自美国 Invitrogen 公司;活性氧(ROS)检测试剂盒、总谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒购自上海碧云天生物公司;C11-氟化硼络合二吡咯甲川(C11-BF₂-2-dipyrromethene, C11-BODIPY)染料、苯绿 SK(Phenol green SK, Phen green SK)指示剂、SYBR 绿色 qPCR 超级混合液通用型(SYBR green-ER qPCR SuperMix universal)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;FPN1, FTH, FTL, TFR1、溶质载体家族 7 成员 11(Solute carrier family 7member 11, SLC7A11)、GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司。酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;Stratagene MX3000P qPCR 仪购自上海普迪生物技术有限公司。

1.2 细胞培养、分组

将购于中科院上海细胞库的人胶质瘤细胞 SH-SY5Y 进行复苏,然后置于含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基,在 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中培养。

实验分组为 DMSO 组(加入常规培养基)、MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT)、Z-VAD-FMK + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 20 μmol/L 的 Z-VAD-FMK)、Nec-1 + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 1 μmol/L 的 Nec-1)、Chloroquine + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 5 mmol/L 的 Chloroquine)、DFO 对照组(加入 20 μmol/L 的 DFO)^[10]及 DFO + MT 组(加入 1 mmol/L 的 MT 和 20 μmol/L 的 DFO);48 h 后收集细胞进行指标水平检测。

1.3 细胞活性实验

将各组 SH-SY5Y 细胞接种至 96 孔细胞板,分别加入 CCK-8 试剂,使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值并计算其细胞活性。

1.4 细胞死亡实验

以 PI 为细胞死亡的荧光分信号。分别在经过处理的各组 SH-SY5Y 细胞中加入水平为 5 mg/mL 的 PI,30 min 后在显微镜下对明场图像和 PI 图像进行拍照保存,并结合流式细胞仪定量分析各组 SH-SY5Y 细胞死亡情况。

1.5 细胞铁水平的测定

使用 Hank's 平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)对各组 SH-SY5Y 细胞进行洗涤,然后加入 5 μmol/L 的苯绿 SK(Phenol green SK, Phen green SK)荧光指示剂,37 °C 下孵育 30 min,再次用 HBSS 洗涤,胰酶消化后进行离心并收集细胞,上流式细胞仪检测 Phen green SK 的荧光。

1.6 总 ROS 水平的测定

按照 ROS 检测试剂盒说明书处理细胞,然后加入 10 μmol/L 稀释过的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA),37 °C 孵育 20 min,洗去多余的 DCFH-DA;细胞内酯酶可将 DCFH-DA 水解为无荧光的二氢二氯荧光素(Dichlorodihydrofluorescein, DCFH);细胞内的 ROS 可将 DCFH 氧化并产生荧光的二氯荧光素(Dichlorofluorescein, DCF);采用流式细胞术检测 DCF 的荧光。

1.7 lipid ROS 水平的测定

收集各组 SH-SY5Y 细胞,分别加入 5 μmol/L

C11-BODIPY,孵育 30 min,接着用磷酸缓冲盐溶液进行洗涤和重悬,上流式细胞仪,在 590 和 510 nm 波长下检测 DCF 荧光强度。

1.8 GSH 水平的测定

根据总 GSH 检测试剂盒说明书的方法测定各组 SH-SY5Y 细胞在 410 nm 波长处吸光度值并分析 GSH 的相对水平。

1.9 Western blot 实验

提取各组 SH-SY5Y 细胞总蛋白,定量后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳,将分离出的蛋白样品转至聚偏氟乙烯膜上;室温下采用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h,然后加入 FPN1, FTH, FTL, TFR1 和 SLC7A11 一抗,4 °C 孵育 24 h;再加入相应二抗,室温下孵育 1 h;使用增强化学发光(Enhanced chemiluminescence, ECL)系统和 ImageJ 软件分析其蛋白相对表达水平,以 GAPDH 作为内参。

1.10 qRT-PCR 实验

TRIzol 试剂(TRIzol reagent, TRIzol)法提取各组细胞总 RNA,并将其逆转录成 cDNA;采用 SYBR greenER qPCR SuperMix universal 进行 qRT-PCR 体系的配置,并按照说明书在 Stratagene MX3000P qPCR 仪器上运行,以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt}方法定量分析 SLC7A11 水平。

1.11 统计学处理

采用 SPSS23.0;计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。流式细胞仪所得数据采用 Flow Jo 软件进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MT 对 SH-SY5Y 细胞增殖的影响

与 0 mmol/L MT 比较,0.25、0.5 和 1 mmol/L MT 处理的 SH-SY5Y 细胞活性明显降低($P < 0.05$),且 1 mmol/L 处理的 SH-SY5Y 细胞活性最低,故后续实验采用 1 mmol/L MT 诱导细胞(表 1)。

2.2 MT 对不同抑制剂处理后 SH-SY5Y 细胞活性的影响

与 DMSO 组比较,DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞活性显著升高($P < 0.05$),而 Z-VAD-FMK + MT

组、Nec-1 + MT 组和 chloroquine + MT 组 SH-SY5Y 细胞活性有所升高,但无明显差异($P>0.05$) (表 2)。

表 1 不同水平 MT 对 SH-SY5Y 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

MT 水平	细胞活性
0 mmol/L	100.00 \pm 0.11
0.25 mmol/L	75.24 \pm 0.15 *
0.5 mmol/L	56.61 \pm 0.12 *
1 mmol/L	38.43 \pm 0.09 *

注:与 0 mmol/L 比较, * $P<0.05$

表 2 MT 对不同抑制剂处理下 SH-SY5Y 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9, \%$)

组别	细胞活性
DMSO 组	47.69 \pm 1.25
Z-VAD-FMK + MT 组	49.47 \pm 1.38
Nec-1 + MT 组	49.16 \pm 1.41
chloroquine + MT 组	49.19 \pm 1.37
DFO + MT 组	80.11 \pm 3.59 *

注:与 DMSO 组比较, * $P<0.05$

2.3 MT 对 SH-SY5Y 细胞铁依赖性死亡的影响

MT 组 SH-SY5Y 细胞中 Fe^{2+} 和相对 PI 荧光水平均显著高于 DMSO 组($P<0.05$);与 MT 组比较,DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞中 Fe^{2+} 和相对 PI 荧光水平均明显降低($P<0.05$);DFO 对照组 SH-SY5Y 细胞中 Fe^{2+} 和相对 PI 荧光水平与 DMSO 组

比较差异不显著($P>0.05$) (图 1、表 3)。

表 3 MT 对 SH-SY5Y 细胞相对 Fe^{2+} 和 PI 荧光水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	相对 Fe^{2+} 水平	相对 PI 荧光水平
DMSO 组	1.01 \pm 0.03	0.99 \pm 0.04
MT 组	1.98 \pm 0.15 *	1.93 \pm 0.01 *
DFO + MT 组	0.55 \pm 0.09 #	1.38 \pm 0.02 #
DFO 对照组	0.97 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03

注:与 DMSO 组比较, * $P<0.05$;与 MT 组比较, # $P<0.05$

2.4 MT 对 SH-SY5Y 细胞铁死亡生化指标水平的影响

与 DMSO 组比较,MT 组 SH-SY5Y 细胞中总 ROS 和 lipid ROS 水平显著上升、GSH 水平显著下降($P<0.05$);与 MT 组比较,DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞中总 ROS 和 lipid ROS 水平明显下降, GSH 水平明显上升($P<0.05$),而 DFO 对照组与 DMSO 组 SH-SY5Y 细胞中总 ROS, lipid ROS 和 GSH 水平比较差异不显著($P>0.05$) (表 4)。

表 4 MT 对 SH-SY5Y 细胞铁死亡生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	总 ROS	lipid ROS	GSH(%)
DMSO 组	1.00 \pm 0.02	1.01 \pm 0.05	100.00 \pm 5.23
MT 组	2.85 \pm 0.06 *	1.89 \pm 0.12 *	63.42 \pm 1.05 *
DFO + MT 组	1.53 \pm 0.05 #	0.62 \pm 0.02 #	88.47 \pm 3.59 #
DFO 对照组	0.99 \pm 0.03	1.11 \pm 0.03	98.79 \pm 4.62

注:与 DMSO 组比较, * $P<0.05$;与 MT 组比较, # $P<0.05$

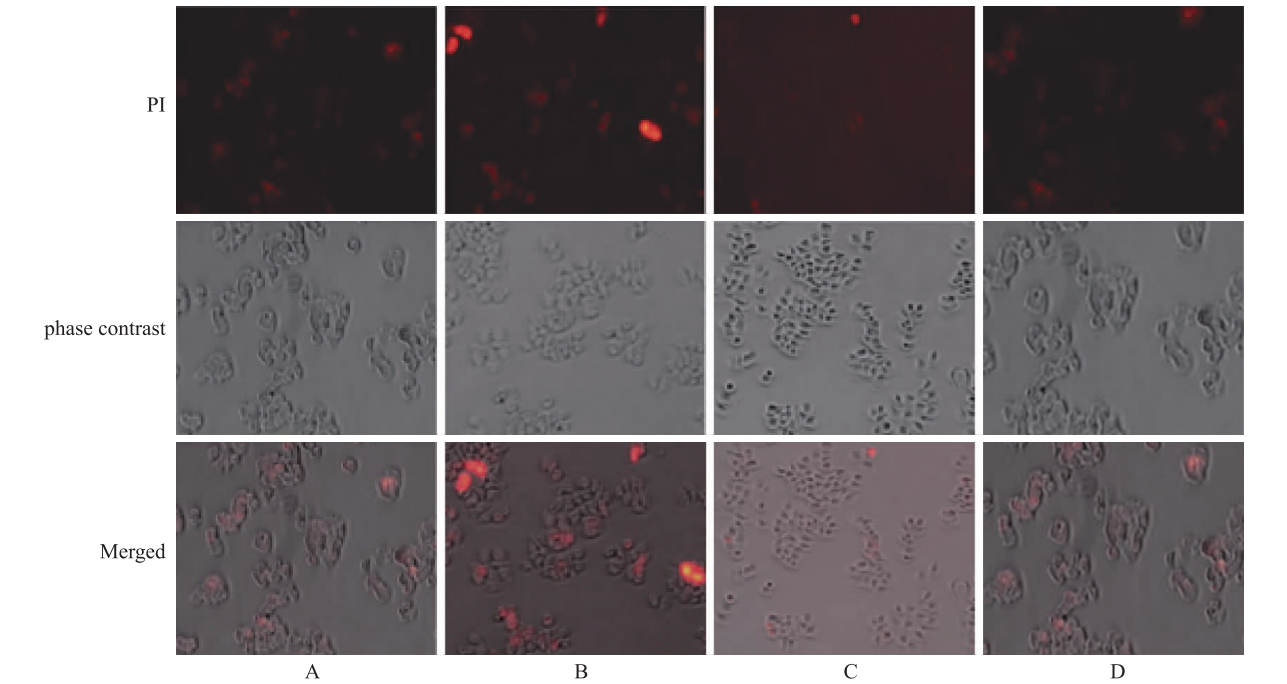


图 1 PI 染色结合流式细胞仪检测 SH-SY5Y 细胞死亡 A 为 DMSO 组;B 为 MT 组;C 为 DFO + MT 组;D 为 DFO 对照组

2.5 MT 对 SH-SY5Y 细胞铁死亡相关蛋白相对表达水平的影响

与 DMSO 组比较,MT 组 SH-SY5Y 细胞中 FPN1,FTH 和 FTL 蛋白表达水平明显降低,TFR1 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与 MT 组比较,DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞中 FPN1,FTH 和 FTL 蛋白表达水平明显升高,TFR1 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),而 DFO 对照组与 DMSO 组 SH-SY5Y 细胞中 FPN1,FTH,FTL 和 TFR1 蛋白表达水平无明显差异($P>0.05$)(图 2、表 5)。

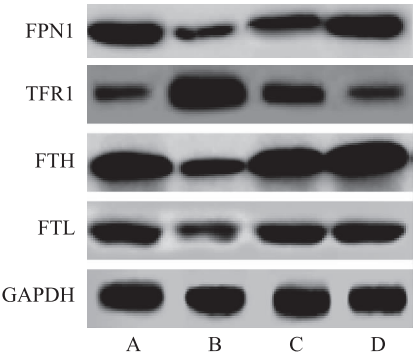


图 2 各组 SH-SY5Y 细胞中铁死亡相关蛋白表达水平比较 A 为 DMSO 组;B 为 MT 组;C 为 DFO + MT 组;D 为 DFO 对照组

表 5 MT 对 SH-SY5Y 细胞铁死亡相关蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	FPN1/ GAPDH	TFR1/ GAPDH	FTH/ GAPDH	FTL/ GAPDH
DMSO 组	1.01 ± 0.11	0.26 ± 0.03	1.45 ± 0.13	1.07 ± 0.10
MT 组	0.34 ± 0.04*	1.53 ± 0.13*	0.46 ± 0.05*	0.21 ± 0.06*
DFO + MT 组	0.82 ± 0.09#	0.86 ± 0.05#	1.23 ± 0.13#	0.87 ± 0.09#
DFO 对照组	1.05 ± 0.14	0.29 ± 0.03	1.49 ± 0.15	1.08 ± 0.11

注:与 DMSO 组比较,* $P<0.05$;与 MT 组比较,# $P<0.05$

2.6 MT 通过下调 SLC7A11 来诱导 SH-SY5Y 细胞铁死亡

MT 组 SH-SY5Y 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白表达水平均显著低于 DMSO 组($P<0.05$),而 DFO 对照组与 DMSO 组 SH-SY5Y 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白表达水平的差异不显著($P>0.05$);与 MT 组比较,DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)(图 3、表 6)。

3 讨论

胶质瘤是严重威胁人类健康的恶性肿瘤,其治

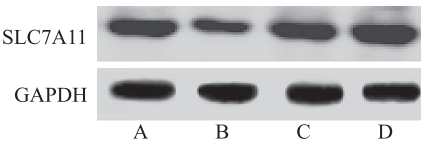


图 3 各组 SH-SY5Y 细胞中 SLC7A11 蛋白表达水平比较 A 为 MSO 组;B 为 MT 组;C 为 DFO + MT 组;D: DFO 对照组

表 6 各组 SH-SY5Y 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	SLC7A11 mRNA 水平	SLC7A11 蛋白水平
DMSO 组	0.99 ± 0.02	0.79 ± 0.03
MT 组	0.43 ± 1.21*	0.23 ± 0.01*
DFO + MT 组	0.80 ± 0.05#	0.67 ± 0.03#
DFO 对照组	1.01 ± 0.03	0.76 ± 0.02

注:与 DMSO 组比较,* $P<0.05$;与 MT 组比较,# $P<0.05$

疗方式一般是手术联合放疗或化疗,但效果不佳,患者的生存率依然较低^[11]。因而,寻找合适的靶向药物对提高胶质瘤患者生存率来说具有重要的意义。

细胞死亡是机体维持生命活动的一种机制,而凋亡、坏死、焦亡和自噬是细胞死亡的具体形式。据报道,MT 可通过松果体、卵巢、肝脏等多种器官被释放,且具有诱导凋亡进而抵抗肿瘤的作用^[12]。已有研究显示,MT 可通过自噬诱导胶质瘤细胞凋亡^[13]。然而,MT 与细胞铁死亡的关系尚不清楚。本研究首先通过使用不同水平的 MT 处理胶质瘤 SH-SY5Y 细胞,结果显示 MT 处理过的 SH-SY5Y 细胞活性显著降低($P<0.05$),且细胞活性随着 MT 水平的升高而降低,说明 MT 可显著抑制胶质瘤细胞增殖。由于 1 mmol/L 处理的 SH-SY5Y 细胞活性最低,故后续实验均采用 1 mmol/L MT 诱导细胞;接着,本研究在使用 1 mmol/L MT 处理细胞的基础上加入不同类型的细胞死亡抑制剂(Z-VAD-FMK, Nec-1 和 Chloroquine)和铁清除剂(DFO),通过检测其细胞活性发现,与 DMSO 组比较,Z-VAD-FMK 组、Nec-1 组和 Chloroquine 组细胞活性有所升高,但不具有统计学意义,而 DFO + MT 组 SH-SY5Y 细胞活性显著升高($P<0.05$),这揭示 DFO 可恢复 MT 对 SH-SY5Y 细胞活性的抑制作用。进一步研究发现,MT 可显著提高 SH-SY5Y 细胞中 Fe^{2+} 水平并诱导细胞死亡,而 DFO 的加入则抑制了上述作用,表明 MT 可诱导胶质瘤细胞发生铁依赖性细胞死亡。

据文献报道,铁死亡与传统的细胞死亡形式不同,其核心特点是亚铁离子水平的增高、ROS 的大量

累积^[14]。铁死亡发生时细胞中胱氨酸的摄取和 GSH 的合成降低, GSH 水平的下降会导致 ROS 聚集, 最终使细胞被杀伤^[15]。本研究结果显示, MT 组 SH-SY5Y 细胞中总 ROS 和 lipid ROS 水平显著上升、GSH 水平显著下降($P < 0.05$), 而 DFO 介入后各项指标水平得到逆转, 进一步揭示 MT 对胶质瘤细胞铁死亡的诱导作用, 而 DFO 可逆转这种作用。铁代谢紊乱是诱导铁死亡的主要原因, FPN1, FTH, FTL 和 TFR1 是铁代谢标志蛋白^[16]。FPN1 是目前已知的最活跃的铁转出蛋白亚型, TFR1 则能促进细胞对铁的摄取。本研究通过 Western blot 实验发现, MT 可明显降低 SH-SY5Y 细胞中 FPN1, FTH 和 FTL 蛋白表达水平, 提高 TFR1 蛋白表达水平($P < 0.05$), 而 DFO 的加入使 SH-SY5Y 细胞中 FPN1, FTH 和 FTL 蛋白表达水平升高, TFR1 蛋白表达水平降低($P < 0.05$), 但 DFO 本身对这些蛋白的表达水平并无明显影响, 这提示 MT 可通过调控铁代谢相关蛋白的表达来诱导胶质瘤细胞铁死亡。

SLC7A11 是溶质载体家族的一员, 可促进 GSH 的合成, 抑制细胞死亡^[17]。在大肠癌^[18]、胃癌^[19]、肺癌^[20]等肿瘤细胞中 SLC7A11 均呈现高表达, 而抑制 SLC7A11 表达可诱导细胞凋亡。本研究结果显示, MT 组 SH-SY5Y 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白表达水平显著低于 DMSO 组($P < 0.05$), 而 DFO+MT 组 H-SY5Y 细胞中 SLC7A11 mRNA 和蛋白表达水平显著高于 MT 组($P < 0.05$), 这说明 MT 能够通过下调 SLC7A11 水平来诱导胶质瘤细胞发生铁死亡。

综上所述, MT 可诱导胶质瘤细胞铁死亡, 其机制是下调 SLC7A11 表达, 提高细胞内 Fe^{2+} 和 ROS 水平并降低 GSH 水平, 为胶质瘤的治疗提供新的潜在靶向药物。本研究只是初步建立了 MT 与铁死亡的关系, 其作用机制还需要更加深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Zhou SY, Cui GZ, Yan XL, et al. Mechanism of ferroptosis and its relationships with other types of programmed cell death: insights for potential interventions after intracerebral hemorrhage[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14(1): 589042.
- [2] An JR, Zhao YS, Luo LF, et al. Huperzine A reduces brain iron overload and alleviates cognitive deficit in mice exposed to chronic intermittent hypoxia[J]. *Life Sci*, 2020, 250(1): 117573.
- [3] Yang Y, Luo M, Zhang K, et al. Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 433.
- [4] Liu P, Feng Y, Li H, et al. Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting ferroptosis[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25(1): 10.
- [5] 吴晗, 于森, 肖诚, 等. 铁过载及铁死亡与代谢相关脂肪性肝病的研究进展[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(8): 836-840.
- [6] Kong X, Gao R, Wang Z, et al. Melatonin: a potential therapeutic option for breast cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2020, 31(11): 859-871.
- [7] Irvani S, Eslami P, Dooghaie MA, et al. The role of melatonin in colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(3): 748-753.
- [8] Pourhanifeh MH, Sharifi M, Reiter RJ, et al. Melatonin and non-small cell lung cancer: new insights into signaling pathways[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 131.
- [9] Gu J, Lu Z, Ji C, et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93(1): 969-975.
- [10] Yang J, Zhou Y, Xie S, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 206.
- [11] Voitova AA, Dmitrieva MD, Dymova MA, et al. Tumor specific peptides selected for targeted delivery of therapeutic agents to glioma human cells[J]. *Russ J Bioorgan Chem*, 2019, 45(6): 783-792.
- [12] 朱雯婷, 陈亦清, 刘晓敏, 等. 褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SK-OV3 细胞增殖抑制及凋亡作用的相关机制研究[J]. *中南药学*, 2021, 19(8): 1519-1523.
- [13] Zhou N, Wei ZX, Qi ZX. Inhibition of autophagy triggers melatonin-induced apoptosis in glioblastoma cells[J]. *BMC Neurosci*, 2019, 20(1): 63.
- [14] Zhang H, Deng T, Liu R, et al. CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 43.
- [15] Zhang Z, Guo M, Li Y, et al. RNA-binding protein ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells[J]. *Autophagy*, 2020, 16(8): 1482-1505.
- [16] Luo Q, Hu J, Yang G, et al. Fasting increases iron export by modulating ferroportin 1 expression through the ghrelin/GH-SR1 α /MAPK pathway in the liver[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199(1): 267-277.
- [17] Liu Z, Lv X, Song E, et al. Fostered Nrf2 expression antagonizes iron overload and glutathione depletion to promote resistance of neuron-like cells to ferroptosis[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 407(1): 115241.
- [18] Zhang L, Liu W, Liu F, et al. IMCA induces ferroptosis mediated by SLC7A11 through the AMPK/mTOR pathway in colorectal cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020 (1): 1675613.
- [19] Guan Z, Chen J, Li X, et al. Tanshinone IIA induces ferroptosis in gastric cancer cells through p53-mediated SLC7A11 down-regulation[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20201807.
- [20] Yuan B, Liao F, Shi ZZ, et al. Dihydroartemisinin inhibits the proliferation, colony formation and induces ferroptosis of lung cancer cells by inhibiting PRIM2/SLC7A11 axis[J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13(1): 10829-10840.