

骨肉瘤专题

引用:朱青,李明,王佳音,等.姜黄素经 SLC7A11 调控骨肉瘤细胞铁死亡机制初探[J].陕西中医药大学学报,2024,47(2):17-21.

姜黄素经 SLC7A11 调控骨肉瘤 细胞铁死亡机制初探*

朱青¹ 李明¹ 王佳音¹ 吴太鼎¹ 陈宗海¹ 朱垚² 陈龙菊^{1**}

(1.湖北民族大学医学部,湖北 恩施 445000;2.南京中医药大学,江苏 南京 210029)

摘要:目的 初步探讨姜黄素(curcumin, Cur)经 SLC7A11 调控对骨肉瘤 U-2 OS 细胞铁死亡的影响。方法 CCK-8 法检测 0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cur 对 U-2 OS 细胞抑制的影响,同时在倒置显微镜下观察细胞形态学的变化。其次,将体外培养 U-2 OS 细胞随机分为 Con 组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Fer-1 组(4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Cur 组(40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Cur+Fer-1 组(40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)用 Western blot 法检测 SLC7A11 的表达。结果 Cur 在浓度为 10~80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时均对 U-2 OS 细胞显著性抑制。进一步研究表明,Cur 可以显著诱导 U-2 OS 细胞铁死亡,下调 SLC7A11 的表达。结论 Cur 可以诱导 U-2 OS 细胞铁死亡,其机制可能是通过下调 SLC7A11 实现铁死亡。

关键词:姜黄素;溶质载体家族 7 成员 11;骨肉瘤;铁死亡

中图分类号:B21, R221

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)02-0017-05

DOI:10.13424/j.cnki.jstcm.2024.02.004

Preliminary Study on the Mechanism of Curcumin Regulating Iron Death in Osteosarcoma Cells through SLC7A11

ZHU Qing¹ LI Ming¹ WANG Jiayin¹ WU Taiding¹

CHEN Zonghai¹ ZHU Yao² CHEN Longju¹

(1. Medical Department of Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of curcumin (Cur) on ferroptosis in osteosarcoma U-2 OS cells based on SLC7A11. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the effect of Cur at 0, 5, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ on the inhibition of U2-OS cells, and the morphological changes of cells were observed under an inverted microscope. Secondly, U-2 OS cells cultured in vitro were randomly divided into Con group (0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Fer-1 group (4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Cur group (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and Cur+Fer-1 group (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and the expression of SLC7A11 was detected using Western blot. **Results** Cur significantly inhibited U-2 OS cells at concentrations of 10-80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Further research has shown that Cur can significantly induce ferroptosis in U-2 OS cells and downregulate the expression of SLC7A11. **Conclusion** Cur can induce ferroptosis in U-2 OS cells, and its mechanism may be achieved by downregulating SLC7A11 to achieve ferroptosis.

Key words: Curcumin; 7 members of the solute carrier family 11; Osteosarcoma; Ferroptosis

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)、软骨肉瘤和尤因肉瘤是三种最常见的原发性恶性骨肿瘤,多采用化

疗加手术治疗,广泛切除术是所有原发性恶性骨肿瘤手术治疗的金标准,但其中常伴有化疗耐药

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81260192)

** 通讯作者:陈龙菊,教授。E-mail:1997029@hbmzu.edu.cn

和不敏感问题^[1-2],且作为一种高度异质性的恶性骨肿瘤,其具有高度转移倾向常导致预后不良^[3]。其中,OS是一种起源于间充质组织(纺锤形基质细胞,可产生骨样组织)的恶性肿瘤,占全球原发性恶性骨肿瘤病例的20%^[4],常见于10~30岁的人群,OS最常见的形成部位是:膝盖(股骨远端和胫骨近端)和肩部(肱骨近端)^[5]。虽然随着保肢手术、新辅助化疗、免疫治疗的发展,5年生存率显著提高^[6],但是化疗耐药,副作用大以及免疫疗法价格昂贵等问题亟待解决。因此,寻求低副作用、高安全性、价格低廉的抗肿瘤方法及用药迫在眉睫。近年来,发现中药提取物作为天然化合物在铁死亡方面具有明确的抗肿瘤特性,逐渐成为研究的热点问题。

肿瘤细胞由于需要迅速增殖,比正常细胞对铁有更高的需求,这使得肿瘤细胞在铁稳态失衡时,比正常细胞对铁死亡更加敏感^[7]。当过量的铁通过芬顿反应的方式氧化脂质并产生大量活性氧,则会促使细胞发生铁死亡。化疗药如甲氨蝶呤、顺铂有促使肿瘤细胞发生脂质氧化的特征^[8-9],但由于其具有一定的副作用,寻找天然化合物作为诱导肿瘤细胞铁死亡的治疗药物具有极大的研究价值。姜黄素(curcumin, Cur)主要从多种姜科植物如姜黄、莪术等干燥根茎中提取得到^[10]。Cur可以抑制多种肿瘤细胞的生长,抗肿瘤谱广、毒副作用小,对肿瘤的发生、发展多阶段均有明显的抑制效果,美国国立肿瘤研究所已将姜黄素列为第3代癌化学预防药^[11]。将Cur用于肿瘤铁死亡的研究发现其可以抑制乳腺癌^[12]、滤泡性甲状腺癌^[13]、非小细胞肺癌^[14]等,暂还未发现Cur对U-2 OS细胞铁死亡的研究。因此,本研究观察Cur对U-2 OS细胞铁死亡的作用,并以溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)为切入点初步探索其作用机制,为临床防治骨肉瘤提供新的思路及支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 无菌超净台(苏州净化设备公司);电泳和转膜仪(Bio-Rad);全波长酶标仪(Thermo Fisher);培养皿(60 mm NEST公司;100 mm LABS-ELECT公司);超声仪(凡帝朗公司);CKX41-C31B倒置荧光显微镜(奥林巴斯有限公司)等。

1.2 试剂 人骨肉瘤细胞株U-2 OS(目录号SC-SP-5030)购自中国科学院细胞库;铁死亡抑制剂

(ferrostatin-1, Fer-1;纯度99.96%;批号HY-100579)购自美国MCE公司;姜黄素(纯度:98.1%;批号110823-202107)购自中国食品药品检定研究院;U-2 OS细胞专用培养基(货号CM-0236)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;活性氧ROS检测试剂盒(绿色荧光;货号C1300-1)购自北京普利莱基因科技有限公司;还原性谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(货号WLA105a)购自沈阳万类科技有限公司;CCK-8试剂盒(货号RM02823)、SLC7A11抗体(货号A2413)、 β -actin抗体(货号AC026)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;RIPA裂解液、Bradford蛋白浓度测定试剂盒(货号P0013B、P0006C)购自上海碧云天生物技术有限公司。

2 方法

2.1 U-2 OS细胞培养 将冻存的U-2 OS细胞融化在37℃条件下,1000 r·min⁻¹离心5 min后观察积淀情况,去废液后重悬培养在U-2 OS细胞专用培养基中,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中,待细胞生长至80%融合时进行细胞传代,用于后续实验。

2.2 CCK-8法筛选姜黄素的浓度 以约5000个/孔的密度接种在96孔板传代培养24 h,加入终浓度0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素处理24 h,使用CCK-8细胞活力检测试剂盒测定各孔吸光度,孵育1 h后使用酶标仪450 nm处检测各孔吸光度,计算细胞存活率,以确定Cur最佳的作用浓度。

2.3 姜黄素对U-2 OS细胞形态的影响 细胞均匀接种于6孔板中,置于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养24 h,细胞贴壁后,随机分为6组,分别加入姜黄素0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,处理24 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态的变化,并拍照记录细胞形态。

2.4 Western blot法检测蛋白表达 实验分组为Con组、Fer-1组(4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Cur组(40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Cur+Fer-1组(40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ +4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),将细胞接种于60 mm培养皿中,待细胞长至80%,予Cur处理24 h,收集细胞。加入上样缓冲液,混匀,99℃煮沸5 min,进行SDS-PAGE凝胶电泳,转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭1 h, TBST清洗3遍,孵I抗过夜, TBST清洗3遍,孵荧光II抗,然后再用Odyssey红外线系统显影,用Image J软件测量条带的灰度值。

2.5 还原型谷胱甘肽(GSH)测定 实验分组及处理方式同“2.4”。使用还原型谷胱甘肽(GSH)测

定试剂盒测定细胞内 GSH 含量,实验步骤严格按照说明书进行。

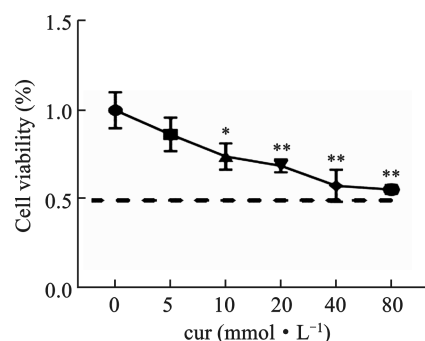
2.6 活性氧(ROS)测定 实验分组及处理方式同 2.4。每孔加入稀释好的 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 探针溶液。 37°C 条件下避光孵育 30 min, PBS 洗 2 次,至于倒置荧光显微镜下拍照,用 Image J 软件测量荧光值。

2.7 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析,两组间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有显著性统计学意义。

3 结果

3.1 姜黄素处理后对 U-2 OS 细胞活力的影响 采用不同质量浓度的 Cur 处理 U-2 OS 细胞 24 h 后,CCK-8 检测结果表明,与对照组比较,Cur 可以

降低 U-2 OS 细胞存活率,呈剂量相关性。见图 1。

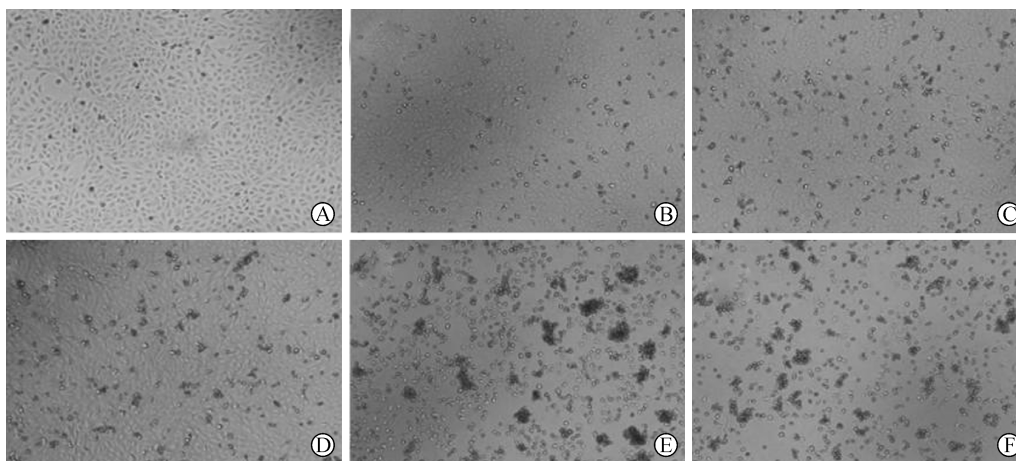


注:与 Con 组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 1 不同浓度姜黄素(Cur)对 U-2 OS 细胞活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 姜黄素处理后对 U-2 OS 细胞形态学的影响

倒置显微镜下观察 U-2 OS 细胞形态学变化,与 Con 组相比,Cur 组细胞形态随浓度增加逐渐变圆、细胞透亮、脱落、空泡形成、细胞间隙增大。见图 2。

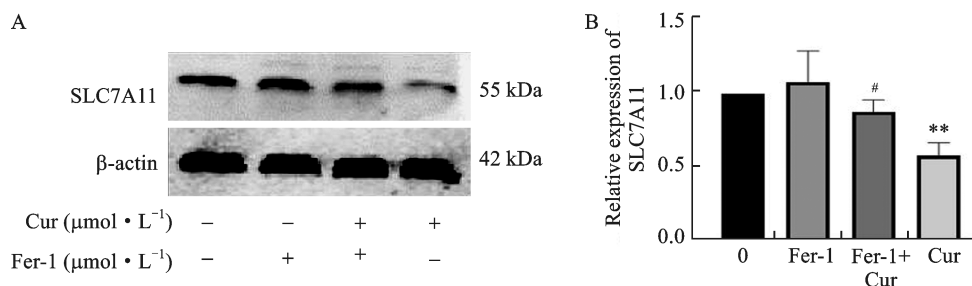


注:A.Con 组;B. $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组;C. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组;D. $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组;E. $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组;F. $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素组

图 2 倒置显微镜下细胞形态学的改变($400\times$)

3.3 Fer-1 逆转姜黄素诱导的 U-2 OS 细胞 SLC7A11 蛋白表达水平 与 Con 组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比,Cur 组($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 SLC7A11 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);而当药物组使用铁抑制剂 Fer-1 干预

后,SLC7A11 蛋白表达明显上升($P < 0.05$),结果表明 Cur 可能通过 SLC7A11 调控 U-2 OS 细胞铁死亡的发生。见图 3。

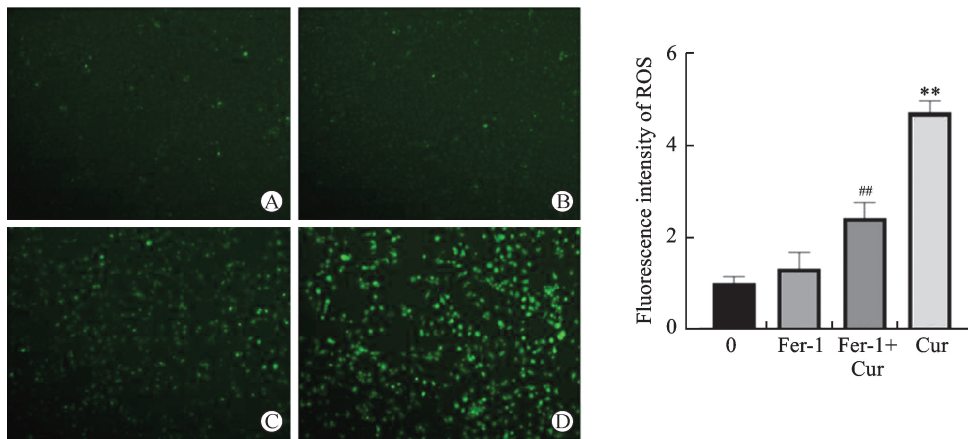


注:与 Con 组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比** $P < 0.01$,与 Cur 组($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)# $P < 0.05$

图 3 姜黄素(Cur)和 ferrostatin-1(Fer-1)对 U-2 OS 细胞 SLC7A11 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

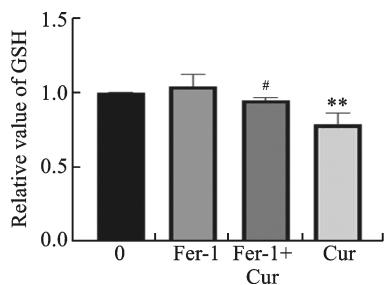
3.4 Fer-1 逆转姜黄素诱导的 U-2 OS 细胞 ROS 水平升高、GSH 水平降低 ROS 的升高和 GSH 的耗竭都是铁死亡的重要特征。如图 4、图 5 所示,与 Con 组比较,Cur 组细胞中 ROS 的荧光强度明显增强($P<0.01$)、GSH 水平降低($P<0.01$);给予铁抑

制剂 Fer-1 后,显著抑制 Cur 引起的 ROS 水平升高($P<0.01$),显著上调 GSH 水平($P<0.05$)。表明 Cur 能够诱导 U-2 OS 细胞发生脂质过氧化损伤,而 Fer-1 可以逆转这一现象。



注:A.Con 组;B.Fer-1 组($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);C.Cur+Fer-1 组($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);D.Cur 组($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);与 con 组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比 ** $P<0.01$,与 Cur 组相比 ## $P<0.01$

图 4 姜黄素 (Cur) 和 ferrostatin-1 (Fer-1) 对 U-2 OS 细胞 ROS 表达的影响 (100 μm)



注:与 Con 组($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)相比 ** $P<0.01$,与 Cur 组相比 # $P<0.05$

图 5 姜黄素 (Cur) 和 ferrostatin-1 (Fer-1) 对 U-2 OS 细胞 GSH 表达的影响

4 讨论

中医学虽无 OS 这一病名,但是根据其症状和体征的描述,可将其归为“骨瘤”这一范畴,OS 临床症状主要以疼痛、质硬、不断增大的肿块为多见。病因病机总属本虚标实,肾虚为主,寒邪、血瘀、癌毒为其标。姜黄素为姜黄属植物的提取物具有活血化瘀的药理特性^[15],可活血化瘀。目前对于诱导 OS 细胞的死亡方式有凋亡、自噬、铁死亡等方式^[16-18]。近年来,铁死亡被广泛研究,其先决条件可能与含多不饱和脂肪酸磷脂 (PUFA-PL) 的合成及过氧化、铁代谢和线粒体代谢有关,而其防御系统可能与 GPX4-GSH、FSP1-CoQH2、DHODH-CoQH2、GCH1-BH4 有关,当促进铁死亡的细胞活

性显著超过铁死亡防御系统提供的解毒能力时,细胞膜上脂质过氧化物的致命积累便会导致随后的膜破裂和细胞铁死亡^[19]。

胱氨酸-谷氨酸反向转运体 (System-Xc) 是由跨膜转运蛋白 SLC7A11 及跨膜调节蛋白 SLC3A2 组成的胞内抗氧化体系,可将胱氨酸还原为半胱氨酸,参与合成 GSH,是许多铁死亡诱导剂的作用靶点,当 System-Xc 及相关反应物的活性及数量受到影响时,细胞内活性氧生成与降解失去平衡,会造成铁死亡的发生。研究发现,SLC7A11 在肺癌^[20,21]、肝癌^[22]、卵巢癌^[23]、膀胱癌^[24]、结肠癌^[25]、乳腺癌^[26] 等恶性肿瘤细胞内高表达,且多与预后不良有关,调控其可以抑制肿瘤的恶性发展。SLC7A11 在肿瘤细胞中高表达,以响应高消耗的 GSH 应对氧化应激,而调控 SLC7A11 可以使肿瘤细胞的防御系统失调,从而促使铁死亡的发生,被逐步发现可能是肿瘤治疗的潜在靶点。本研究表明,干预 SLC7A11 表达可抑制 OS 细胞在体外的生长与增殖,SLC7A11 功能失调经证明能够增加细胞内 ROS 水平,降低 GSH 水平,导致 OS 细胞铁死亡。

综上所述,Cur 可以显著抑制 U-2 OS 细胞的增殖,其机制可能是通过下调 SLC7A11 的表达,减

少 GSH 的生成,促进 ROS 的增多,而这一现象可以被铁抑制剂 Fer-1 逆转,提示 Cur 可能是一种有效诱导 U-2 OS 细胞铁死亡的天然化合物,具有良好的抗肿瘤活性。本文研究为 SLC7A11 对 U-2 OS 细胞铁死亡的影响提供了一定的实验支撑,但是现有实验表明 SLC7A11 还受众多上游机制调控,如 Nrf2、P53 等,后续研究将通过体外实验进一步验证 Cur 调控铁死亡治疗 OS 的药效与机制以及通过透射电镜观察细胞线粒体形态学改变。

参考文献

- [1] Funovics PT. Primary malignant bone tumors [J]. Orthopädie (Heidelb), 2023, 52(6): 509-522.
- [2] Keil L. Bone Tumors: Primary Bone Cancers [J]. FP Es-sent, 2020, 493: 22-26.
- [3] Liu D, Peng Y, Li X, et al. Comprehensive landscape of TGF β -related signature in osteosarcoma for predicting prognosis, immune characteristics, and therapeutic response [J]. J Bone Oncol, 2023, 40: 100484.
- [4] Zhao X, Wu QR, Gong XQ, et al. Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches [J]. Biomed Eng Online, 2021, 20(1): 24.
- [5] Meltzer PS, Helman LJ. New Horizons in the Treatment of Osteosarcoma [J]. N Engl J Med, 2021, 385(22): 2066-2076.
- [6] Chen CL, Xie Lu, Ren TT, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: Fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs [J]. Cancer Lett, 2021, 500: 1-10.
- [7] 林海英杰. 姜黄素类似物 EF24 通过 HMOX-1 介导骨肉瘤细胞铁死亡的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2020.
- [8] Soula M, Weber RA, Zilka O, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(12): 1351-1360.
- [9] Guo JP, Xu BF, Han Qi, et al. Ferroptosis: A novel anti-tumor action for cisplatin [J]. Cancer Res Treat, 2018, 50(2): 445-460.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [S]. 2020 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 2.
- [11] 韦星船. 姜黄素类似物的合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 广州: 广东工业大学, 2011.
- [12] Cao XL, Li Y, Wang YB, et al. Curcumin suppresses tumorigenesis by ferroptosis in breast cancer [J]. PLoS One, 2022, 17(1): e0261370.
- [13] Chen HJ, Li ZF, Xu JC, et al. Curcumin induces ferroptosis in follicular thyroid cancer by upregulating ho-1 expression [J]. Oxid Med Cell Longev, 2023: 6896790.
- [14] Tang X, Ding H, Liang ML, et al. Curcumin induces ferroptosis in non-small-cell lung cancer via activating autophagy [J]. Thorac Cancer, 2021, 12(8): 1219-1230.
- [15] 孙静, 孙艳涛, 张振秋. 中药莪术中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 714-716.
- [16] Huang ZH, Jin GY. Licochalcone B induced apoptosis and autophagy in osteosarcoma tumor cells via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45(6): 730-737.
- [17] Zheng YD, He Z, Su ZC, et al. Bufalin induces apoptosis and autophagy via the Ca²⁺/CaMKK β /AMPK/Beclin1 signaling pathway in osteosarcoma cells [J]. Cell Biology international, 2023, 47(8): 1344-1353.
- [18] Wen RJ, Dong X, Zhuang HW, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis [J]. Phytomedicine, 2023, 116: 154881.
- [19] Luo ZP, Li DW, Luo XB, et al. Curcumin may serve an anticancer role in human osteosarcoma cell line U-2 OS by targeting ITPR1 [J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 5593-5601.
- [20] Wang XB, Chen YQ, Wang XD, et al. Stem cell factor SOX2 confers ferroptosis resistance in lung cancer via up-regulation of SLC7A11 [J]. Cancer Res, 2021, 81(20): 5217-5229.
- [21] Zhang WJ, Sun Y, Bai L, et al. RBMS1 regulates lung cancer ferroptosis through translational control of SLC7A11 [J]. J Clin Invest, 2021, 131(22): e152067.
- [22] Chen QP, Zheng W, Guan J, et al. SOCS2-enhanced ubiquitination of SLC7A11 promotes ferroptosis and radiosensitization in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Differ, 2023, 30(1): 137-151.
- [23] Hong T, Lei G, Chen X, et al. PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer [J]. Redox Biol, 2021: 101928.
- [24] Shen LL, Zhang JF, Zheng ZT, et al. PHGDH inhibits ferroptosis and promotes malignant progression by upregulating SLC7A11 in bladder cancer [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(14): 5459-5474.
- [25] Cheng X, Wang YD, Liu LC, et al. SLC7A11, a potential therapeutic target through induced ferroptosis in colon adenocarcinoma [J]. Front Mol Biosci, 2022: 889688.
- [26] Yang JJ, Zhou YL, Xie SD, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 206.

(修回日期: 2023-09-26 编辑: 杨芳艳)