

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.02.0110

论著

端粒酶 TERT 通过向线粒体转位抵抗胃癌细胞铁死亡的发生机制

刘思琪,郝名英,黄欣宇,耿鑫

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系,天津 300070)

摘要 目的:探究胃癌细胞铁死亡发生时,端粒酶 TERT 如何抵抗铁死亡的发生。方法:提取胃癌细胞 BGC823 的线粒体及细胞总蛋白,通过蛋白质印迹实验检测 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理细胞后,铁死亡相关蛋白 SLC7A11、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)及端粒酶蛋白 TERT 表达量的变化以及线粒体中 TERT 含量变化;通过免疫荧光实验检测 TERT 是否定位于线粒体;使用 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib 预处理细胞后再加入 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理细胞,通过免疫荧光实验检测 TERT 与线粒体定位情况;通过活性氧簇(ROS)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、 Fe^{2+} 检测试剂盒分别检测 ROS、MDA、 Fe^{2+} 含量变化;通过 CCK-8 及划痕实验检测细胞生长、增殖及迁移能力。结果:蛋白质印迹实验结果显示,GPX4($t=15.30, P<0.001$)、SLC7A11($t=5.228, P<0.01$)、TERT($t=3.682, P<0.05$)水平明显降低,线粒体中 TERT 含量降低($t=6.736, P<0.001$)。免疫荧光实验结果显示,TERT 定位于线粒体,联合用药组细胞免疫荧光实验结果显示 TERT 更多的定位在细胞核。联合用药组与单独用药组相比,铁死亡指标 ROS($t=4.109, P<0.05$)、MDA($t=6.491, P<0.01$)、 Fe^{2+} ($F=9.703, P<0.01$)含量均升高,CCK-8($F=4.706, P<0.05$)及划痕实验($t=4.631, P<0.05$)结果显示细胞增殖、迁移能力进一步降低。结论:铁死亡发生时,TERT 由细胞核向线粒体进行转位,使用 bosutinib 抑制 TERT 向线粒体转位后,铁死亡相关指标增强,抑制 TERT 转位可以增强铁死亡的发生,抑制胃癌细胞生长、增殖。

关键词 端粒酶;胃癌;铁死亡;线粒体

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)02-0110-06

The mechanism of telomerase TERT resisting ferroptosis in gastric cancer cells by translocating to mitochondria

LIU Siqi, HAO Mingying, HUANG Xinyu, GENG Xin

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore how telomerase TERT resists ferroptosis in gastric cancer cells. **Methods:** Mitochondria and total cell proteins of gastric cancer cell BGC823 were extracted. Changes in the expression levels of ferroptosis related proteins SLC7A11, glutathione peroxidase 4 (GPX4), and telomerase protein TERT after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin in cells were detected by Western blotting. Whether TERT was localized in mitochondria was detected through immunofluorescence assay. TERT and mitochondrial localization were detected by immunofluorescence assay after 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib pretreatment and 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin treatment of cells. Changes in ROS, MDA, and Fe^{2+} contents were detected by reactive oxygen species (ROS) detection kit, malondialdehyde (MDA) detection kit, and Fe^{2+} detection kit, respectively. Cell growth, proliferation, and migration were measured by CCK-8 and wound healing. **Results:** Western blotting showed a significant decrease in GPX4 ($t=15.30, P<0.001$), SLC7A11 ($t=5.228, P<0.01$), and TERT ($t=3.682, P<0.05$) protein levels, and reduction in the content of TERT in mitochondria ($t=6.736, P<0.001$). The immunofluorescence experiment results showed that TERT was localized in mitochondria, and the combined use of the drug group showed that TERT was more localized in the nucleus. Compared with the monotherapy group, the combination therapy group showed an increase in iron death markers ROS ($t=4.109, P<0.05$), MDA ($t=6.491, P<0.01$), and Fe^{2+} ($F=9.703, P<0.01$) content. The CCK-8 and wound healing results showed a further decrease in cell proliferation and migration ability. **Conclusion:** When ferroptosis occurs, TERT translocates from the nucleus to mitochondria. Inhibiting TERT translocation to mitochondria with bosutinib enhances ferroptosis related indicators, indicating that inhibiting TERT translocation can enhance ferroptosis and inhibit the growth and proliferation of gastric cancer cells.

Key words telomerase; gastric cancer; ferroptosis; mitochondria

基金项目 天津市教科科研计划(2021ZD037)

作者简介 刘思琪(1998-),女,硕士在读,研究方向:医学生物化学与分子生物学;通信作者:耿鑫,E-mail: gengx@tmu.edu.cn。

胃癌是全球第五大常见癌症,死亡率很高,是癌症相关死亡的第三大常见原因^[1]。超过 90% 的胃癌是胃腺癌,平均 5 年生存率不到 20%^[2]。早期胃癌的主

要治疗方法是内窥镜切除,非早期胃癌主要为手术治疗、放化疗以及免疫治疗相结合的方式^[3],但治愈率没有显著提升,因此需要探究靶向治疗胃癌的方法。

自2012年以来,铁死亡已被确定作为一种不同于坏死性凋亡、细胞凋亡和自噬的新型调节性细胞死亡^[4]。铁死亡涉及活性氧簇(ROS)的积累并导致细胞的致命损伤。氨基酸反向转运体系(Xc-系统)可以促进谷胱甘肽(GSH)的合成^[5]。GSH通过促进谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的表达从而抑制脂质过氧化物的积累,使得铁死亡过程受到抑制。Erastin等小分子可抑制Xc-系统的活性,导致细胞内GSH、GPX4表达水平下降以及脂质过氧化物的积累,最终导致细胞发生铁死亡^[6]。

端粒酶在细胞核内负责维持端粒长度及稳定性。已有文献报道,细胞发生氧化应激时,通过src激酶磷酸化707位酪氨酸来诱导TERT核输出,从而使线粒体基质中TERT含量升高^[7]。线粒体中的TERT可以减少ROS的产生,保护线粒体DNA(mtDNA)免受损伤,对线粒体呼吸链发挥保护作用,从而促进肿瘤细胞的耐药性^[8-9]。肿瘤细胞中含有铁死亡发生的自我保护机制即铁死亡防御机制,目前报道的有以下4种:GPX4通过还原型GSH解毒脂质过氧化物并抑制铁死亡^[10];铁死亡抑制蛋白(FSP)1作为一种氧化还原酶,主要在质膜上将CoQ还原为CoQH₂,然后作为亲脂性自由基捕获抗氧化剂来解毒脂质过氧化自由基^[11];线粒体中的二氢酸脱氢酶(DHODH)介导的铁死亡防御机制,与线粒体GPX4协同作用,将泛素还原为泛素醇来抑制线粒体内膜中铁死亡的发生^[12];线粒体cGAS通过与线粒体外膜上的动力相关蛋白(DRP)1结合,促进其寡聚化来抑制线粒体中铁死亡的发生^[13]。

已经有文献报道,铁死亡发生时伴随着氧化应激,因此本课题主要探究铁死亡发生时,TERT是否向线粒体转位,从而抵抗铁死亡的发生及其对胃癌细胞生长增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 人胃腺癌BGC823细胞系;DMEM高糖培养基(Gibco),高纯度胎牛血清(FBS)、细胞胰蛋白酶(Biological Industries);PBS缓冲液;Erastin(HY-15763,美国MCE公司);Bosutinib(SKI-606,美国Selleck Chemicals公司);GAPDH抗体(10494-1-AP,Proteintech);TERT抗体(ab32020,Abcam);GPX4抗体(67763-1-Ig,proteintech);HisH3抗体(17168-1-AP,proteintech);VDAC抗体(10866-1-AP,proteintech);AlexaFluor 488标记山羊抗兔IgG(H+L)荧光抗体(ab150077,Abcam);Mito-Track-

erDeepRedFM(线粒体远红外荧光探针,C1032,中国碧云天生物技术有限公司);山羊血清(C0265,中国碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白质浓度检测试剂盒(PC0020,北京索莱宝科技有限公司);超敏ECL化学发光试剂盒(P0018S,中国碧云天生物技术有限公司);线粒体提取试剂盒(SM0020,北京索莱宝科技有限公司);丙二醛(MDA)测定试剂盒(A003-1-1,南京建成生物工程研究所);CCK-8检测试剂盒(C3007,中国碧云天生物技术有限公司);细胞CO₂恒温培养箱、-80℃冰箱、荧光显微镜、多功能酶标仪购自美国ThermoFisher Scientific有限公司;超净工作台购自江苏通净化设备有限公司;恒温水浴锅购自美国Crystal公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及传代 使用含有10%FBS,1%青-链霉素的DMEM高糖培养基培养人胃癌细胞系BGC823细胞,置于5% CO₂、37℃恒温培养箱培养,待细胞贴壁后用胰蛋白酶消化细胞并传代,不传代的细胞1~2 d更换1次培养基。

1.2.2 药物配制 将1 mg erastin粉末溶于0.1828 mL DMSO中,使其浓度为10 mmol/L,实验所需药物终浓度为10 μmol/L,以1:1 000的比例稀释药物加入到培养基中处理细胞。5 mg bosutinib粉末溶于0.942 6 mL DMSO中,其浓度为10 mmol/L,实验所需药物终浓度为5 μmol/L,以1:2 000的比例稀释药物加入到培养基中处理细胞。

1.2.3 蛋白质印迹实验 取对数生长期BGC823细胞接种于6 cm皿,使其密度为70%,待细胞贴壁后进行转染或加药处理,48 h后使用胰酶消化细胞,向细胞沉淀中加入预先配置好的蛋白裂解液(RIPA: PIC: PMSF为100: 2: 1配置蛋白裂解液)提取细胞总蛋白。使用BCA法检测蛋白浓度。经过10%SDS-PAGE凝胶电泳分离后将蛋白转印在PVDF膜,置于慢速摇床上,使用脱脂牛奶室温封闭2 h,随后将相应条带目的蛋白孵育在对应的特异性一抗中4℃孵育过夜,使用TBST洗膜3次,室温孵育二抗2 h, TBST洗膜3次后使用ECL发光液进行蛋白质含量检测,包括GAPDH、TERT、VDAC、GPX4、SLC7A11蛋白。

1.2.4 提取线粒体实验 取对数生长期BGC823细胞接种于15 cm皿,待细胞贴壁后进行加药处理,48 h后胰酶消化细胞并计数,取5×10⁷个细胞,加入1.0 mL冰预冷的Lysis Buffer重悬细胞,将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内,0℃冰浴研磨30~40次。将细胞匀浆物转移到离心管,4℃,1 000×g离心5 min;取上清,转移至新的离心管中,4℃,1 000×g再次离心5 min。取上清,转移至新的离心管中,

4℃, 12 000×g 离心 10 min。离心后线粒体沉淀在管底, 用 50 μL StoreBuffer 重悬线粒体沉淀, 立即使用或-80℃保存。

1.2.5 免疫荧光实验 取对数生长的 BGC823 细胞铺于 6 孔板中, 分为 DMSO、10 μmol/L erastin、5 μmol/L bosutinib 及联合使用两种药物组。待细胞贴壁后, DMSO 组加入 2 μL DMSO; erastin 组吸取 2 μL 配制好的药物原液加入到 2 mL 培养基中使其浓度为 10 μmol/L; bosutinib 组吸取 1 μL 配制好的药物原液加入到 2 mL 培养基中使其浓度为 5 μmol/L; 联合用药组于实验开始前使用 bosutinib 预处理细胞 24 h, 弃去培养基, 用 PBS 缓冲液洗 3 次后加入新的培养基, 同时吸取两种药物加入到培养基中, 48 h 后弃去含有药物的培养基, 用 PBS 缓冲液洗 3 次, 每孔加入 1 mL DMSO 和 0.5 μL Mito-TrackerRed 线粒体探针混合液, 放入细胞培养箱中孵育 20 min, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 用 PBS 缓冲液置于摇床上洗 3 次, 加入 0.3% Triton-100 透化细胞 15 min, PBS 缓冲液洗 3 次, 加入山羊血清于 37℃ 孵育 30 min; 以 1:50 的比例稀释 TERT 抗体, 在 4℃ 冰箱中孵育过夜; PBS 缓冲液洗 3 次后以 1:1 000 比例配制 AlexaFluor488 抗体稀释液, 室温孵育 1 h 后 PBS 缓冲液洗 3 次, 滴加 DAPI 封片剂即可置于荧光显微镜下拍摄。

1.2.6 ROS 含量检测实验 取对数生长的 BGC823 细胞铺于 6 孔板中, 使其细胞密度在 70% 左右, 分为 DMSO、10 μmol/L erastin、5 μmol/L bosutinib 及联合使用两种药物组。分组方法同“1.2.5”。联合用药组 48 h 后弃去含有药物的培养基, 每孔加入 1.5 mL DMEM, 按照 1:500 比例加入 DCFH-DA 荧光探针, 置于 37℃ 细胞培养箱中孵育 20 min, 用 PBS 缓冲液冲洗 3 次后, 置于荧光显微镜下拍照。

1.2.7 MDA 含量检测实验 取对数生长的 BGC823 细胞铺于 10 cm 皿中, 加药处理 48 h, 胰酶消化细胞, 用 PBS 洗 1 次, 加入 300 μL PBS 吹匀细胞沉淀, 反复冻融 2 次后置于冰上 5 min, 4℃ 10 000×g 离心 10 min, 取 200 μL 上清加入相应试剂, 放入 95℃ 水浴锅 80 min, 将试管冷却至室温后 4 000 r/min 离心 10 min, 取 100 μL 上清于 96 孔板中, 设置 3 重复, 使用酶标仪检测 532 nm 处吸光度。

1.2.8 亚铁离子含量检测实验 取对数生长期的 BGC823 细胞铺于 6 cm 皿中, 分为 DMSO、10 μmol/L erastin、5 μmol/L bosutinib 及联合使用两种药物组。待细胞贴壁后 DMSO 组加入 3 μL DMSO; erastin 组吸取 3 μL 药物原液加入到培养基中; bosutinib 组吸取 1.5 μmol 药物原液加入到培养基中; 联合用药组

于实验开始前使用 bosutinib 预处理细胞 24 h, 弃去培养基, PBS 缓冲液洗 3 次后加入新的培养基, 同时吸取两种药物加入到培养基中, 48 h 后弃去含有药物的培养基, 胰酶消化细胞离心后弃液, 加入试剂盒中的试剂一, 充分混匀后放置在冰盒上裂解 10 min, 15 000×g 离心 10 min, 取上清液 80 μL 加入 96 孔板中, 再加入试剂二 80 μL、试剂三 80 μL, 拍打混匀置于 37℃ 孵育 10 min, 在酶标仪 593 nm 处测定 OD 值, 通过计算得到细胞中亚铁离子含量。

1.2.9 CCK-8 实验 取对数生长的 BGC823 细胞接种于 96 孔板中分为 DMSO、10 μmol/L erastin、5 μmol/L bosutinib 及联合使用两种药物组。待细胞贴壁后 DMSO 组加入 0.2 μL DMSO; erastin 组吸取 0.2 μL 配制好的药物原液加入到培养基中; bosutinib 组吸取 0.1 mL 配制好的药物原液加入到培养基中; 联合用药组于同时吸取两种药物加入到培养基中, 检测吸光度之前更换含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 100 μL 并加入 10 μL CCK-8 溶液, 置于细胞培养箱中孵育 1 h。于 0、24、48、72、96 h 检测细胞 450 nm 处的吸光值, 使用 GraphPad 软件绘制其生长曲线。

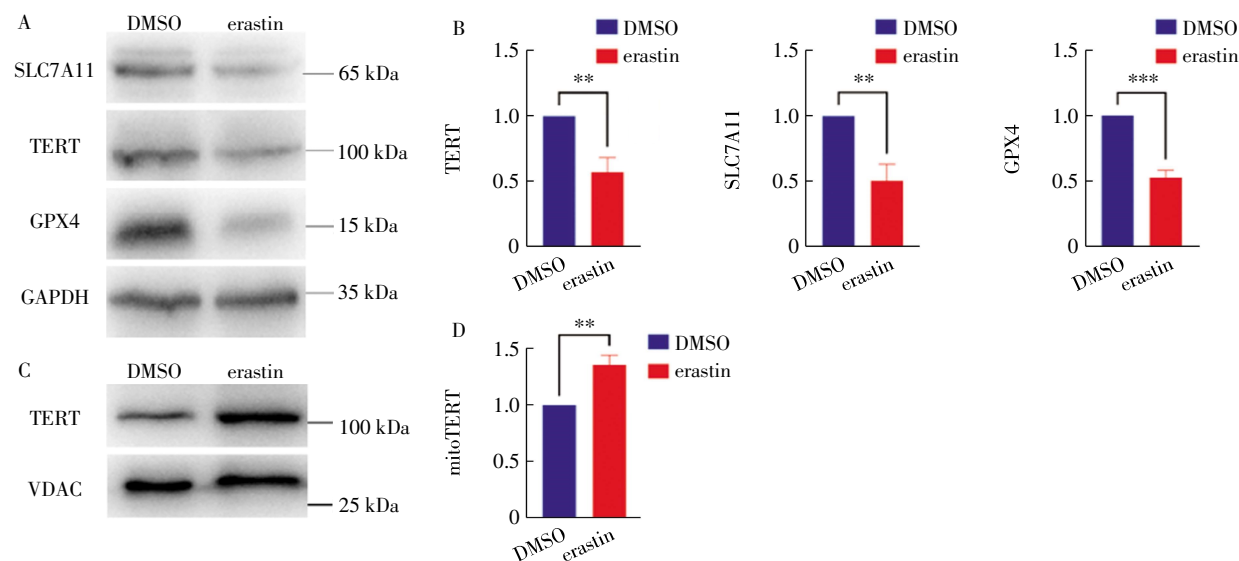
1.2.10 划痕实验 取对数生长的 BGC823 细胞铺满 6 孔板, 分为 DMSO、10 μmol/L erastin、5 μmol/L bosutinib 及联合使用两种药物组。待细胞贴壁后, 用移液枪枪头在 6 孔板内划痕并在显微镜下拍照记录 0 h 细胞状态, 拍照后将培养基换成无血清的 DMEM, DMSO 组加入 2 μL DMSO; erastin 组加入 2 μL 药物原液; bosutinib 组加入 1 μL 药物原液; 联合用药组同时吸取两种药物加入, 于 24、48 h 在显微镜下拍照记录细胞状态, 使用 Image J 进行数据处理分析。

1.3 统计学处理 通过 GraphPad Prism 9.0 进行数据分析和作图。所有实验均已重复 3 次, 数据符合正态分布, 采用 *t* 检验进行差异分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 铁死亡发生时 TERT 向线粒体转位 蛋白质印迹实验结果显示, 与 DMSO 组相比, 使用 erastin 处理细胞 48 h 后 BGC823 细胞内 GPX4 ($t=15.30$, $P < 0.001$)、SLC7A11 ($t=5.228$, $P < 0.01$) 蛋白表达量明显降低, TERT 蛋白表达量也降低 ($t=3.682$, $P < 0.05$)。分离线粒体进行蛋白质印迹检测, 结果显示, 在 erastin 处理后, 线粒体中 TERT 蛋白含量明显升高 ($t=6.736$, $P < 0.001$), 见图 1。免疫荧光实验结果显示, 与 DMSO 组相比, 加入 erastin 处理细胞后, TERT 更多的定位在线粒体上 (图 2A)。

2.2 抑制 TERT 向线粒体转位后铁死亡发生情况 使用 bosutinib 处理细胞来抑制酪氨酸磷酸化, 从



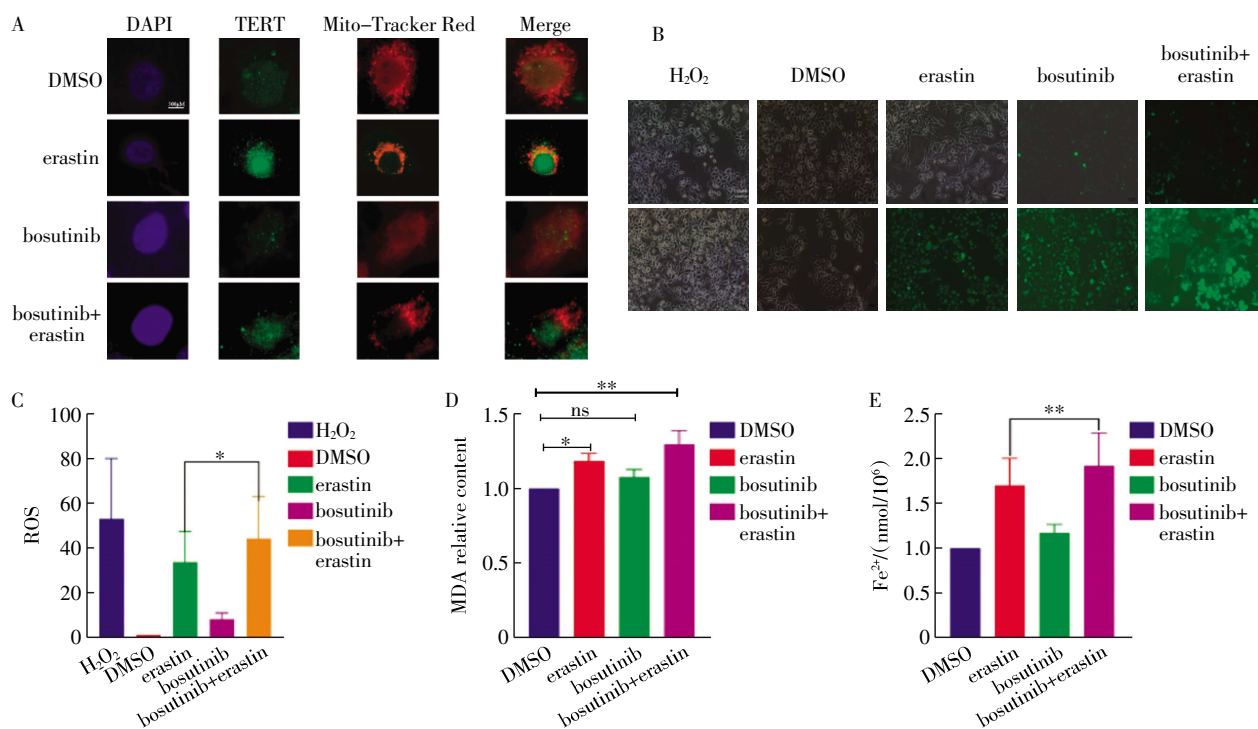
注:A:蛋白质印迹实验检测 erastin 处理后总蛋白中 SLC7A11、TERT、GPX4 蛋白水平;B:3 次蛋白质印迹统计分析结果;C:erastin 处理后线粒体中 TERT 蛋白水平变化;D:3 次蛋白质印迹统计分析结果;SLC7A11:溶质载体家族 7 成员 11;TERT:端粒酶逆转录酶;GPX4:谷胱甘肽过氧化物酶 4; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$

图 1 Erastin 处理细胞后总蛋白中 GPX4、TERT 蛋白水平变化及线粒体中 TERT 蛋白水平变化

Fig.1 Changes of GPX4 and TERT protein levels in total proteins and TERT protein levels in mitochondria of cells treated by erastin

而抑制 TERT 向线粒体转位,免疫荧光实验表明,与单独使用 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理组相比,同时使用 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib 和 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理细胞后, TERT 更多的定位在细胞核上(图 2A)。检测铁死亡相关指标发现,与 DMSO 组相比,加 10 $\mu\text{mol/L}$

erastin 处理组 ROS、MDA、 Fe^{2+} 水平均升高,同时使用 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib 和 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,细胞 ROS ($t=4.109$, $P<0.05$)、MDA ($t=6.491$, $P<0.01$)、 Fe^{2+} ($F=9.703$, $P<0.01$) 水平升高更明显(图 2B~E)。



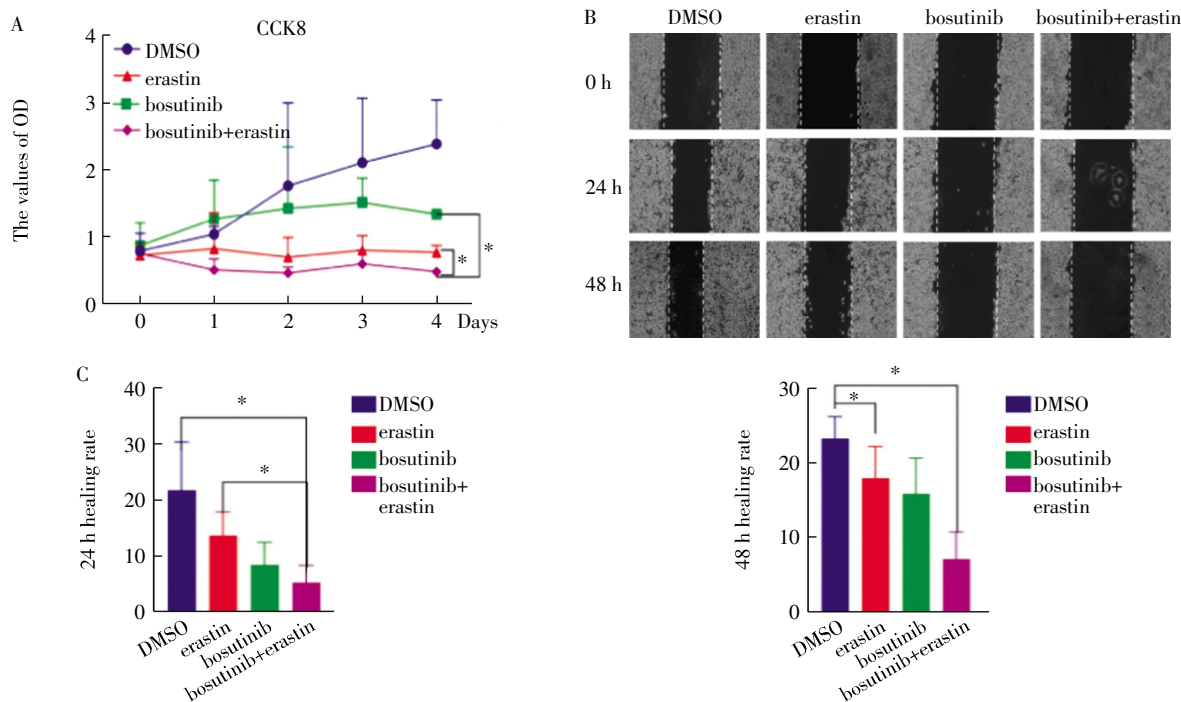
注:A:免疫荧光实验检测用 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib、10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后 TERT 定位在线粒体的情况;B:5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib、10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,检测 BGC823 细胞内 ROS 水平;C:3 次 ROS 检测实验统计学结果;D:5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib、10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,检测 BGC823 细胞内 MDA 水平 3 次实验统计学结果;E:5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib、10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后检测 BGC823 细胞内 Fe^{2+} 水平 3 次实验统计学结果;ROS:活性氧簇;MDA:丙二醛; * $P<0.05$; ** $P<0.01$

图 2 使用 bosutinib 处理细胞抑制 TERT 向线粒体转位后铁死亡相关指标变化情况

Fig.2 Changes of iron death related indicators after inhibition of TERT translocation to mitochondria in cells treated by bosutinib

2.3 联合使用 erastin 及 bosutinib 处理后各组细胞增殖、迁移情况 CCK-8 实验结果表明,与 DMSO 组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理组和 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib 组细胞增殖能力降低,联合使用 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib 和 10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,细胞生长、增殖

能力进一步降低($F=4.706, P<0.05$)。划痕实验结果表明,与 DMSO 组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理组和 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib 组细胞迁移能力降低,联合用药组细胞迁移能力进一步降低($t=4.631, P<0.05$),见图 3。



注:A:CCK8 实验检测 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib、10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后 BGC823 细胞生长增殖情况;B:划痕实验检测 5 $\mu\text{mol/L}$ bosutinib、10 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后 BGC823 细胞迁移能力变化;C:3 次划痕实验统计分析结果;* $P<0.05$

图 3 Bosutinib 及 erastin 处理后各组细胞生长、增殖情况

Fig.3 Growth and proliferation of cells in each group after treatment of bosutinib and erastin

3 讨论

全球每年有超过 100 万的胃癌新病例,其总死亡率仅次于肺癌和结直肠癌^[1]。手术和化疗仍是治疗胃癌的主要方式,特别是对于早期胃癌,传统治疗方式还包括放疗、粒子治疗、免疫治疗、靶向治疗和综合治疗^[2-3]。然而,胃癌通常在早期无症状,并且在诊断时已达到晚期,转移性胃癌的预后较差,接受最佳支持治疗的患者中位生存期为 3~4 个月,接受联合化疗的患者为 11 个月^[14]。

Erastin 诱导的细胞死亡也称为铁死亡,其特征是细胞内 ROS 水平增加,氧化还原状态失衡,脂质过氧化物在细胞膜上积累,导致随后的膜破裂和细胞铁死亡^[9]。近年来,铁死亡在包括肠缺血、炎症性肠病、胃癌和结肠直肠癌在内的胃肠道疾病发生中的作用方面取得了巨大的进展,可为临床治疗提供新的治疗靶点^[15-16]。铁死亡涉及各类肿瘤研究包括:实验试剂如 erastin 和 RSL3;FDA 批准的药物如索拉非尼、柳氮磺胺吡啶、他汀类药物和青蒿素;电离辐射和细胞因子如干扰素 γ 和转化生长因子 $\beta 1$,

均可诱导铁死亡并抑制肿瘤生长^[10,14]。通过铁死亡克服耐药性正在成为一种潜在的癌症疗法。本文通过使用 erastin 诱导胃腺癌 BGC823 细胞发生铁死亡来抑制胃癌的生长增殖,通过铁死亡指标蛋白 GPX4、SLC7A11 蛋白含量降低来证明细胞发生了铁死亡,由于胃癌是端粒酶阳性细胞系,在铁死亡发生时检测到端粒酶 TERT 蛋白含量降低。

端粒酶的典型功能是维持分裂细胞中的端粒长度。此外,端粒酶蛋白 TERT 具有非典型端粒酶功能,例如转位至线粒体,导致氧化应激、DNA 损伤和细胞凋亡减少^[17-18]。线粒体作为细胞内能量产生的枢纽,也负责体内铁代谢和稳态并且是细胞内 ROS 的主要生产者^[8]。铁死亡发生时伴随着氧化应激的发生,erastin 处理细胞后检测到细胞中 ROS 水平升高,TERT 在氧化应激条件下的核输出由 Src 激酶触发^[7,19-20]。本研究通过免疫荧光实验检测到在铁死亡发生时 TERT 由向线粒体进行转位以保护细胞,抵抗铁死亡的发生。Bosutinib 是一种强效的双重 SRC/ABL 激酶抑制剂,临床上获批用于对既往治疗耐药

和(或)不耐受的费城染色体阳性慢性髓性白血病(CML)成人^[21]。有文献报道,bosutinib可抑制TERT由细胞核向线粒体转位,进一步升高肿瘤细胞中ROS水平并引发细胞死亡^[22-24]。本研究发现,在erastin诱导的铁死亡发生时,胃癌细胞BGC823通过TERT向线粒体转位来实现自我保护,从而抵抗铁死亡的发生。在使用bosutinib预处理细胞以抑制TERT向线粒体转位后,再加入erastin可诱导细胞发生铁死亡,与erastin组相比,联合用药组TERT定位于线粒体减少,铁死亡相关指标ROS、MDA、Fe²⁺水平升高,说明抑制TERT向线粒体转位可以增强铁死亡的发生。联合使用erastin及bosutinib组检测与单独使用erastin组相比,BGC823细胞增殖、迁移能力进一步降低。

综上所述,erastin诱导铁死亡发生时TERT向线粒体转位,从而抵抗铁死亡的发生,联合使用erastin和TERT转位抑制剂bosutinib会导致胃癌细胞增殖、迁移进一步被抑制,从而促进铁死亡的发生,为临床治疗端粒酶阳性癌症如胃癌提供思路。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [3] JEONG Y S, EUN Y G, LEE S H, et al. Clinically conserved genomic subtypes of gastric adenocarcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 147.
- [4] 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.
- [5] ZHENG J, CONRAD M. The metabolic underpinnings of ferroptosis[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 920-937.
- [6] ZHANG R, KANG R, TANG D. Ferroptosis in gastrointestinal cancer: from mechanisms to implications[J]. *Cancer Lett*, 2023, 561: 216147.
- [7] HAENDELER J, HOFFMANN J, BRANDES R P, et al. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(13): 4598-4610.
- [8] ROSEN J, JAKOBS P, ALE-AGHA N, et al. Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase-impact on redox homeostasis[J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101543.
- [9] LING X, WEN L, ZHOU Y. Role of mitochondrial translocation of telomerase in hepatocellular carcinoma cells with multidrug resistance[J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(7): 545-554.
- [10] GAN B. Mitochondrial regulation of ferroptosis[J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(9): e202105043.
- [11] WU S, MAO C, KONDIPARTHI L, et al. A ferroptosis defense mechanism mediated by glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mitochondria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(26): e2121987119.
- [12] MAO C, LIU X, ZHANG Y, et al. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer[J]. *Nature*, 2021, 593(7860): 586-590.
- [13] QIU S, ZHONG X, MENG X, et al. Mitochondria-localized cGAS suppresses ferroptosis to promote cancer progression[J]. *Cell Res*, 2023, 33(4): 299-311.
- [14] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296.
- [15] DANG Q, SUN Z, WANG Y, et al. Ferroptosis: a double-edged sword mediating immune tolerance of cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 925.
- [16] PULIGA E, CORSO S, PIETRANTONIO F, et al. Microsatellite instability in gastric cancer: between lights and shadows[J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 95: 102175.
- [17] HAENDELER J, DROSE S, BUCHNER N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 929-935.
- [18] ARNDT G M, MACKENZIE K L. New prospects for targeting telomerase beyond the telomere[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8): 508-524.
- [19] HEIDENREICH B, KUMAR R. TERT promoter mutations in telomere biology[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 771: 15-31.
- [20] INDRAN I R, HANDE M P, PERVAIZ S. hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 266-276.
- [21] ABBAS R, HSYU P H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of bosutinib[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2016, 55(10): 1191-1204.
- [22] CORTES J E, GAMBACORTI-PASSERINI C, DEININGER M W, et al. Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results from the randomized BFORE trial[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(3): 231-237.
- [23] MIWA S, CZAPIEWSKI R, WAN T, et al. Decreased mTOR signalling reduces mitochondrial ROS in brain via accumulation of the telomerase protein TERT within mitochondria[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(10): 2551-2567.
- [24] PATRICK S, GOWDA P, LATHORIA K, et al. YAP1-mediated regulation of mitochondrial dynamics in IDH1 mutant gliomas[J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(22): jcs259188.

(2023-10-10 收稿)