

文章编号 1006-8147(2022)05-0568-04

综述

非编码 RNA 对肺癌中铁死亡调控作用的研究进展

杜林, 陈峰, 徐医军 综述, 张逊 审校

(天津市胸科医院胸外科, 天津 300222)

摘要 铁死亡是最近发现的一种新型细胞程序性死亡方式,在形态学与发生机制等方面区别于其他的细胞死亡方式。同时,非编码 RNA(ncRNA)可以通过影响 mRNA 转录等作用调节下游靶蛋白的表达。近年来研究发现,ncRNA 可以通过影响铁离子代谢、细胞脂代谢和调控谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)等多种机制,参与肺癌的细胞铁死亡过程。因此,与细胞铁死亡相关的 ncRNA 和下游的靶基因可能成为新的肺癌临床标志物和治疗靶点。

关键词 肺癌;铁死亡;非编码 RNA;分子机制

中图分类号 [R34]

文献标志码 A

非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)是所有不被翻译成蛋白质的功能性 RNA 的统称,按照核苷酸大小分类分为小 RNA(miRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)和环状 RNA(circRNA)^[1-3]。ncRNA 可通过调控 mRNA 来影响相关靶基因的表达,各种 ncRNA 之间也存在相互作用。

在 2012 年,研究人员意外发现了一种依赖 Fe²⁺ 催化作用的细胞程序性死亡方式,将其命名为细胞铁死亡^[4]。铁死亡的生物学特征主要表现为线粒体萎缩、膜密度增加、线粒体嵴减少以及活性氧簇(ROS)聚集等^[5]。铁死亡的发生机制包括:(1)Fe²⁺的代谢:转铁蛋白受体(transferring receptor, TFR)介导 Fe²⁺的转运,铁蛋白的两条肽链重链和轻链可以调控 Fe²⁺的储存。(2)脂代谢异常和 ROS 的积累:脂氧合酶(LOX)催化不饱和脂肪酸的过氧化并影响铁死亡,核因子 e2 相关因子 2-kelch 样 ECH 关联蛋白 1(NRF2-KEAP1)系统调节细胞内稳态,抵抗外源性和内源性的氧化损伤,调节机体抗氧化蛋白的表达。(3)谷胱甘肽(GSH)的抗氧化作用:铁蛋白和谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)调控 GSH 的合成,GSH 是一种铁死亡的抑制剂,能通过清除细胞自由基抑制铁死亡,而其合成异常也可导致铁死亡。近期研究表明,铁死亡在肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤的发生、发展及转移过程中起重要作用,成为近年来研究的热点。因此本文对近期 ncRNA 调控肺癌中细胞铁死亡的相关研究进展进行介绍,为肺癌铁死亡相关研究提供参考。

1 lncRNA 通过影响脂代谢和 ROS 积累,调节细胞铁死亡

由于外界因素诱导,细胞内稳态被扰乱,脂质

作者简介 杜林(1988-),男,主治医师,博士在读,研究方向:肺癌基础研究;通信作者:张逊,E-mail: Zhangxun69@163.com。

相关基因表达异常,导致细胞内脂质氧化物大量积累,随即引发细胞铁死亡^[6-7]。因此,对脂质氧化代谢的调控是影响铁死亡的重要机制。Sato 等^[8]采用肺癌 PC9、A549 和 H358 细胞系,对 lncRNA LINC00336 调控细胞铁死亡的机制进行了研究,发现 LINC00336 定位于细胞核内,过表达 LSH 基因可诱导 LINC00336 转录水平的上调,无论是在肺腺癌细胞系还是在肺鳞癌细胞系中都有高表达。进一步研究发现,ELAV 样 RNA 结合蛋白 1(ELAV-like RNA-binding protein 1, ELAVL1)是 LINC00336 的上游调控因子,LSH 可通过抑制 p53 的活性来诱导 ELAVL1 的表达,进而 ELAVL1 通过稳定其转录水平来上调 LINC00336 的表达。随后,通过 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)和 RNA 蛋白拉拽沉淀证实了 LINC00336 通过内源竞争 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)的吸附作用来抑制 miR-6852 的活性,而 miR-6852 的靶蛋白即是 CBS,其同样可发挥 ceRNA 的作用来抑制 CBS mRNA 的转录。因此,LINC00336 对 CBS 有上调作用,最终抑制肿瘤细胞铁死亡,促进肿瘤的形成与发展。该研究完整地呈现了 LSH/p53/ELAVL1/LINC00336/miR-6852/CBS 轴的分子调控机制。另外,Chao 等^[9]研究了 lncRNA MT1DP 调节细胞铁死亡的分子机制,发现 MT1DP 可通过抑制 miR-365a-3p 的表达,进而抑制细胞的抗氧化反应,最终导致细胞的氧化应激反应的激活与加重。MiR-365a-3p 的异常表达可显著下调 NRF2 的表达水平,从而调节 erastin 介导的肺癌细胞铁死亡。这项研究最终证实了可通过 MT1DP/miR-365a-3p/NRF2 轴来调控 erastin 介导的肺癌细胞铁死亡,这两项研究成果为后续研究 lncRNA 调控铁死亡的分子机制提供了理想范例。

2 miRNA 通过影响 GPX4 的表达调控肺癌细胞铁死亡

胱氨酸可在胱氨酸谷氨酸转运受体(System Xc⁻)的作用下还原为半胱氨酸,而后者是GSH合成的原料之一^[10]。GSH可在GPX4的催化作用下由还原型转变为氧化型,同时对细胞内的过氧化物进行还原,以抑制细胞铁死亡^[11]。因此System Xc⁻、GSH、GPX4构成了细胞内重要的抗氧化体系,同时也是细胞铁死亡的重要负调控因子。许多正负调控铁死亡的相关因子都是通过调控这个重要的抗氧化体系来发挥作用的。

研究发现,miR-324-3p是二甲双胍诱导乳腺癌发生细胞铁死亡的靶点,说明miR-324-3p不仅是铁死亡的诱导因素,而且参与了二甲双胍抗乳腺癌的作用机制^[12]。Huang等^[13]以A549/DDP肺癌细胞系为研究对象,结果表明,过表达miR-324-3p的细胞中GPX4表达水平显著降低,而荧光素酶标记的结果也表明,GPX4是miR-324-3p的直接靶点。该研究揭示了A549/DDP细胞中miR-324-3p/GPX4信号轴的作用,且该信号轴也可能是逆转非小细胞肺癌顺铂耐药的潜在靶点。

miR-338是另一种可靶向调控GPX4的miRNA,在肝癌、胃癌、肺癌等肿瘤组织中的表达量与正常组织相比均显著降低^[14-15]。Chen等^[16]和Tarangelo等^[17]采用PCR对肺癌组织、癌旁组织、肺癌细胞系和正常肺部细胞系的miR-338和GPX4 mRNA水平进行检测,并采用双荧光素酶法验证miR-338和GPX4的关系,结果表明,与癌旁组织、正常细胞相比,肺癌组织以及肺癌细胞系中miR-338表达水平均显著降低,双荧光素酶也证实miR-338和GPX4的直接作用。此外,对miR-338进行过表达处理,可以明显提高肿瘤细胞系ROS水平,并有效抑制肿瘤细胞生长和迁移,而加入细胞铁死亡抑制剂,可以削弱甚至逆转miR-338的抑制肿瘤细胞生长和迁移作用。最终证实miR-338可通过负调控GPX4的表达进而促进肿瘤细胞铁死亡,从而抑制肿瘤细胞的生长和迁移。

3 lncRNA 通过调控 p53 的表达促进肺癌细胞铁死亡

众所周知,p53介导的细胞衰老和细胞凋亡是抑制肿瘤生长、迁移的关键。但除此之外,p53还可以通过调节RNA转录或蛋白质翻译来诱导细胞铁死亡的发生^[18-19]。一方面,p53通过抑制溶质载体家族7成员11的表达,或通过提高亚精胺/精胺n1-乙酰转移酶和谷氨酰胺酶2两种重要蛋白的表达

来增强细胞铁死亡;另一方面,p53可通过直接抑制二肽基肽酶4的蛋白活性来抑制erastin所诱导的细胞铁死亡的发生,还可通过诱导cyclin依赖激酶抑制因子表达、减缓细胞内GSH的消耗和减少ROS积累来抑制细胞铁死亡。由此可见,p53对细胞铁死亡的调控具有明显的生物双向性,这与细胞系、细胞环境息息相关。因此p53上下游相关通路的调控对铁死亡的影响是十分复杂的。Song等^[20]和Kenneth等^[21]对比了A549等7种肺癌细胞系和MRC-5等2种正常肺部细胞系的细胞质中lncRNA p53RRA的表达水平,结果表明,在肿瘤细胞中,p53RRA表达水平显著下调。证明p53RRA可以直接作用于靶蛋白功能域,从而调控p53的表达和移位,促进细胞铁死亡,抑制肿瘤的进展。

4 ncRNA 调控肺癌铁死亡的其他机制

Lu等^[22]采用A549肺癌细胞系进行顺铂耐药诱导实验,研究敲降或过表达miR-4443对细胞铁死亡的影响。实验结果表明,过表达miR-4443可以通过与铁死亡抑制蛋白1(FSP1)相互作用,进而抑制顺铂介导的细胞铁死亡,并促进肺部肿瘤的体内生长。另一项研究发现,lncRNA NEAT1在肺癌细胞铁死亡中具有重要调节作用^[23]。酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)是一种重要的脂肪酸激活酶,可通过调节细胞脂质组合来影响细胞铁死亡的敏感性,是一种经典的细胞铁死亡抑制因子。通过生物信息学分析发现,NEAT1和ACSL4具有直接结合的分子靶区,表明NEAT1与ACSL4的靶向结合可以抑制ACSL4的正常表达,导致肺癌细胞对细胞铁死亡的敏感性。同时,NEAT1增强了肺癌细胞对erastin诱导细胞铁死亡的敏感性,最终导致肺癌细胞的铁死亡。

5 肺癌细胞铁死亡 ncRNA 的潜在调控靶点

5.1 参与肺癌细胞中铁离子的转运调控 细胞铁死亡离不开铁离子的介导。TFR1可以与其配体结合并内化,以维持细胞内铁离子的稳定^[24]。TFR1受多种ncRNA调控,其水平下调可激活细胞铁死亡通路^[25-26]。lncRNA PVT1在肺癌细胞中有表达,且其对肺癌细胞增值的促进作用也已被证实^[27]。PVT1的下游靶向miR-214-3p也可通过下调TFR1,从而对细胞铁死亡有调节作用。但PVT1/miR-214-3p轴对肺癌中铁死亡的作用尚未见报道。

5.2 肺癌铁死亡调控相关ncRNA的生物信息学分析 Kirill等^[28]对TCGA数据库中的肺腺癌转录组数据进行分析,发现9个与铁死亡预后相关的lncRNA,均可独立地用来预测肺腺癌患者的预后,

并可能成为新的治疗靶点。Wu 等^[29]则对非小细胞肺癌的临床样本基因表达谱进行生物信息学分析,最终确定了 10 个既与非小细胞肺癌预后相关,又与细胞铁死亡相关的 lncRNA,然后选取其中 9 个 lncRNA 分子用于构建非小细胞肺癌预后模型,并将非小细胞肺癌患者分为高风险和低风险两组。结果显示,高风险组患者的预后更差。上述研究为临床探索相应的治疗靶点与生物标志物提供了新颖而有益的科研思路。但是,关于 ncRNA 调控肺癌中细胞铁死亡机制的研究仍在起步阶段,现有的文献报道尚未完全揭示肺癌中铁死亡的发生、发展与调控可靠的机制。首先,各项研究都是以肺癌细胞系样本(如 A549、H358 等)为主^[30],并未对临床样本进行大规模、系统化的深入研究与探讨。其次,只有少部分研究探寻了某个 lncRNA/miRNA 轴对下游因子以及铁死亡相关因子的调控作用,很多研究都只停留在某个 lncRNA 或 miRNA 的单一作用上,也未研究其上游有哪些调控因子可以影响其表达,也并未对 ncRNA 调控系统进行全面分析。第三, circRNA 对肿瘤中铁死亡的影响已于其他肿瘤报道^[31],但是在肺癌领域仍未发现 circRNA 对细胞铁死亡的调控作用。第四,细胞铁死亡有其特殊的细胞形态学特征,如线粒体嵴减少、细胞膜破裂等,但有某些关于细胞铁死亡的研究并未给出明确的细胞电镜结果,而现在的学术界普遍认为电镜结果是证明细胞发生铁死亡的金标准^[32]。第五,细胞铁死亡与药物耐药之间的研究仅停留在顺铂等 1~2 种药物上^[33],对于靶向药、免疫检查点抑制剂的耐药,铁死亡抵抗究竟是否参与其中尚不得知。相信随着研究的不断深入,一定能揭示出更多关于铁死亡与肿瘤之间的奥秘,为对抗肿瘤提供更为有利的医学武器。

参考文献:

- [1] INGOLD I, BERNDT C, SCHMITT S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 409-422.
- [2] WAN S Y, ROHITHA S, MATTHEW E W, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1): 317-331.
- [3] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 2019, 75(5): 843-854.
- [4] LV W Y, LI C H, LIN H R, et al. A high-integrated DNA biocomputing platform for MicroRNA sensing in living cells [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 207(17): 114183-114190.
- [5] POTOCHI L, KARBARZ M, ADAMCZYK -GROCHALA J, et al. Silver birch pollen-derived microRNAs promote NF- κ B-mediated inflammation in human lung cells [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 800(15): 149531-149539.
- [6] WANG Z H, WANG D, GUO S, et al. Long noncoding RNA distal-less homeobox 2 antisense 1 restrains inflammatory response and apoptosis of periodontal ligament cells by binding with microRNA-330-3p to regulate Ro60, Y RNA binding protein [J]. *Arch Oral Biol*, 2022, 133(6): 105298-105303.
- [7] LIU N, LIN X, HUANG C. Activation of the reverse transsulfuration pathway through NRF2/CBS confers erastin-induced ferroptosis resistance [J]. *Brit J Cancer*, 2019, 122(2): 1-14.
- [8] SATO H, TAMBA M, ISHII T, et al. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(7): 11455-11458.
- [9] CHAO L, GUO L, YANG N, et al. miR-324-3p suppresses migration and invasion by targeting WNT2B in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17(1): 1-7.
- [10] HOU Y, CAI S, YU S, et al. Metformin induces ferroptosis by targeting miR-324-3p/GPX4 axis in breast cancer [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2021, 56(3): 3-11.
- [11] DENG S H, WU D M, LI L, et al. miR-324-3p reverses cisplatin resistance by inducing GPX4-mediated ferroptosis in lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2021, 549(10): 54-60.
- [12] LI S, JIA H, ZHANG Z, et al. LncRNA GAS6-AS1 facilitates the progression of breast cancer by targeting the miR-324-3p/SETD1A axis to activate the PI3K/AKT pathway [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99(8): 151124-151131.
- [13] HUANG X H, WANG Q, CHEN J S, et al. Bead-based microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma: miR-338 is downregulated [J]. *Hepato Res*, 2010, 39(8): 786-794.
- [14] PENG Y, LIU Y M, LI L C, et al. MicroRNA-338 inhibits growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting NRP1 expression [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94422-e94430.
- [15] 张伟, 彭燕琪, 费思佳, 等. miR-338 通过靶向 GPX4 抑制非小细胞肺癌细胞增殖 [J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(23): 4041-4045.
- [16] CHEN J S, LIANG L L, XU H X, et al. MiR-338-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 112-118.
- [17] TARANGELO A, MAGTANONG L, BIEGING-ROLETT K T, et al. p53 suppresses metabolic stress-induced ferroptosis in cancer cells [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 569-579.
- [18] XIE Y, ZHU S, SONG X, et al. The tumor suppressor p53 limits ferroptosis by blocking DPP4 activity [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(7): 1692-1699.
- [19] MAO C, WANG X, LIU Y, et al. A G3BP1-interacting lncRNA promotes ferroptosis and apoptosis in cancer via nuclear sequestration of p53 [J]. *Cancer Res*, 2018, 56(112): 3484-3490.
- [20] SONG Z, JIA G, MA P, et al. Exosomal miR-4443 promotes cisplatin resistance in non-small cell lung carcinoma by regulating FSP1 m6A modification-mediated ferroptosis [J]. *Life Sci*, 2021, 276(7689): 119399-119406.
- [21] KENNETH N, MUDIE S, NARON S, et al. TIR1 interacts with the IKK complex and is involved in IKK-NF- κ B signaling [J]. *Biochem J*, 2013, 13(28): 449-457.
- [22] LU J, XU F, LU H. LncRNA PVT1 regulates ferroptosis through

- miR-214-mediated TFR1 and p53[J]. Life Sci, 2020, 260(11): 118305-118312.
- [23] YANG Y R, ZANG S Z, ZHONG C L, et al. Increased expression of the lncRNA PVT1 promotes tumorigenesis in non-small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6929-6935.
- [24] LI Y, ZHANG J, PAN S, et al. CircRNA CDR1 as knockdown inhibits progression of non-small-cell lung cancer by regulating miR-219a-5p/SOX5 axis[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3): 112-120.
- [25] BAIT, LIANG R, ZHU R, et al. MicroRNA-214-3p enhances erastin-induced ferroptosis by targeting ATF4 in hepatoma cells[J]. J Cell Physiol, 2020(11): 342-352.
- [26] LE J, NING K, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. Nature, 2019, (18): 262-270.
- [27] YANG X, ZHANG Y, FAN H. Downregulation of SBF2-AS1 functions as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma by inhibiting miR-338-3p-targeted ETS1[J]. Cancer Gene Ther, 2020, (45): 23-33.
- [28] KIRILL B, JOSEPH MH, LI Z, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. Nature, 2019, 575(21): 688-692.
- [29] WU M, ZHANG X, ZHANG W, et al. Cancer stem cell regulated phenotypic plasticity protects metastasized cancer cells from ferroptosis [J]. Nat Commun, 2022, 13(16): 1371-1381.
- [30] SONG X, LIU J, KUANG F, et al. PDK4 dictates metabolic resistance to ferroptosis by suppressing pyruvate oxidation and fatty acid synthesis [J]. Cell Rep, 2021, 34(8): 108767-108775.
- [31] 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]. Chem Biol Interact, 2022, 352(2): 101928-101936.
- [32] LI H, LIU L. Zinc moderates circular RNA CircFOXPI expression in order to regulate ferroptosis during lung adenocarcinoma[J]. Redox Biol, 2021, 42(11): 109760-109768.
- [33] KUGANESAN N, DIAMINI S, TILLEKERATNE L M, et al. Tumor suppressor p53 promotes ferroptosis in oxidative stress conditions independent of modulation of ferroptosis by p21, CDKs, RB, and E2F[J]. J Biol Chem, 2021, 297(6): 101365-101374.

(2022-02-18 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB/T 3558.1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕4个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选择合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 3种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出95%可信区间。

本刊编辑部