

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.03.0193

论著

Erastin 对骨肉瘤细胞生长及增殖的影响

郝名英, 刘思琪, 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 erastin 对骨肉瘤(OS)细胞生长、增殖的影响及其分子机制。方法: 使用 STRING 数据库构建 OS 易突变蛋白、铁死亡相关蛋白和端粒相关蛋白的相互作用网络。检测 2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理 OS 细胞后铁死亡相关指标的变化、端粒替代延长(ALT)相关表型的变化、端粒损伤情况、端粒保护蛋白的变化和对 OS 细胞生长增殖、迁移的影响。结果: STRING 蛋白相互作用网络分析显示, 铁死亡相关蛋白、OS 中突变蛋白和端粒相关蛋白相互作用网络包括 RPA1、BARD1、UBE3A、AURKA、MDM2、SIRT1、CREBBP、IGFBP5、DDX5 及 EP300。2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理 OS 细胞后, Western 印迹显示谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)4、SLC 家族氨基酸转运蛋白(SLC7A11)表达量明显降低($t=13.24, 4.399$, 均 $P<0.05$), 毛细血管扩张性共济失调和 Rad3 相关蛋白(ATR)表达量明显降低($t=10.68, P<0.001$), 端粒重复结合因子(TRF)1、2 表达量明显升高($t=8.006, 10.79$, 均 $P<0.01$); 丙二醛(MDA)检测显示脂质过氧化物含量升高($t=2.951, P<0.05$); 活性氧簇(ROS)检测试剂盒显示, ROS 水平明显增加($q=11.03, P<0.001$); ALT 相关表型结果显示, c-circle 水平明显降低($t=16.20, P<0.0001$), 早幼粒细胞白血病核小体(PML)与端粒的定位明显降低($t=6.018, P<0.01$); 免疫荧光结果显示, 53BP1、 γ -H2AX 与端粒的定位明显增加($q=4.391, 4.653$, 均 $P<0.05$); CCK8、克隆形成实验结果显示, 细胞生长增殖水平降低($t=10.86, 4.972$, 均 $P<0.01$); 划痕实验结果表明, 细胞的迁移水平降低($t=2.953, P<0.05$)。结论: 伴随铁死亡的发生, erastin 可以减弱 ALT 并抑制 OS 细胞的生长、增殖和迁移。

关键词 骨肉瘤; 铁死亡; 端粒替代延长

中图分类号 R34

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0193-07

Effects of erastin on the growth and proliferation of osteosarcoma cells

HAO Mingying, LIU Siqi, 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 the effect of erastin on the growth and proliferation of osteosarcoma (OS) cells and its molecular mechanism. **Methods:** The interaction network of mutant protein with ferroptosis associated protein and telomere related protein in OS was constructed using STRING database. The effects of 2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin treatment on ferroptosis associated protein, alternative lengthening of telomeres (ALT) related phenotype, telomere damage, telomere protective proteins, and growth, proliferation and migration of OS cells were detected. **Results:** The STRING protein interaction network analysis showed that ferroptosis related proteins, mutant proteins in OS, and telomere related protein interaction networks included RPA1, BARD1, UBE3A, AURKA, MDM2, SIRT1, CREBBP, IGFBP5, DDX5 and EP300. After 2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin treatment, Western blotting showed that glutathione peroxidase 4 (GPX4) and SLC family amino acid transporter (SLC7A11) protein expression decreased significantly ($t=13.24, 4.399$, both $P<0.05$). Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) expression was significantly decreased ($t=10.68, P<0.001$). The expression levels of shelterin telomere repeat binding 1 and 2 (TRF1 and TRF2) proteins were significantly increased ($t=8.006, 10.79$, both $P<0.01$). Malondialdehyde (MDA) detection results showed that lipid peroxide content increased ($t=2.951, P<0.05$), and reactive oxygen species (ROS) detection kit results showed that ROS level increased significantly ($q=11.03, P<0.001$). The results of ALT related phenotype showed that c-circle level was significantly decreased ($t=16.20, P<0.0001$), promyelocytic leukemia (PML) and telomere localization were significantly decreased ($t=6.018, P<0.01$). Immunofluorescence results showed that the localization of 53BP1, γ -H2AX and telomeres increased significantly ($q=4.391, 4.653$, both $P<0.05$). CCK8 and the results of clonal formation experiment showed that the cell growth and proliferation level decreased ($t=10.86, 4.972$, both $P<0.01$), the scratch test results showed that the migration level of the cells was reduced ($t=2.953, P<0.05$). **Conclusion:** With the occurrence of ferroptosis, erastin can reduce ALT and inhibit the growth, proliferation and migration of OS cells.

Key words osteosarcoma; ferroptosis; alternative lengthening of telomeres

基金项目 天津市教科科研计划(2021ZD037)

作者简介 郝名英(1997-),男,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。

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的原发性骨肿瘤,最常见于儿童和青少年^[1]。OS 多由具有成骨潜能的间充质干细胞发展而来,具有侵袭性和转移

性,发生转移的患者5年生存率小于20%^[2-3]。目前OS的治疗方式是手术、化疗相结合,可以改善OS患者的预后,但对OS的转移、复发和预后的控制仍不理想^[4]。近20年来,OS患者的治愈率无显著提高^[5]。因此,迫切需要新的治疗策略来改善OS患者的预后。

铁死亡是一种铁依赖性、程序性细胞死亡形式,受细胞抗氧化系统和铁代谢的严格调节^[6]。Erastin是一种小分子化合物,通过抑制胱氨酸-谷氨酸逆向转运蛋白Xc⁻系统,抑制胱氨酸的摄取,导致活性氧簇(ROS)的积累,进而导致铁死亡的发生^[7]。研究发现,促进OS细胞铁死亡,可以有效减弱OS对顺铂的耐药性,这对OS的治疗效果具有重要意义^[2]。因此,从铁死亡的角度探究OS的发病机制可能为OS的治疗提供新的策略。

端粒位于染色体末端的重复核苷酸序列(TTAGGG)区域,可保护染色体免受DNA损伤^[8]。在正常的人体细胞中,端粒随着细胞分裂而逐渐缩短,直到达到极短端粒,会导致基因组不稳定性增加,而导致细胞死亡^[9]。为获得复制的永生性,肿瘤细胞必须克服端粒缩短^[10]。肿瘤细胞通过两种方式延长端粒,绝大多数肿瘤细胞通过端粒酶活性来维持端粒长度,少部分通过端粒替代延长(ALT)机制延长端粒^[11]。有研究指出,经历铁死亡的OS细胞会下调多种耐药基因的表达,这使得OS细胞对阿霉素更加敏感^[12]。另一项体外实验表明,当OS细胞中的铁死亡被激活后,OS细胞对顺铂的耐药性显著降低^[13]。越来越多的研究表明铁死亡可能会改善OS预后不良的局面。较长的端粒在OS中很常见,其通过ALT机制延长端粒,造成基因组的不稳定,并且与不良的临床结果相关^[14]。因此,从铁死亡的角度出发,以ALT机制为切入点,可寻找治疗OS的新策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人骨肉瘤U2OS细胞源自美国细胞培养物收藏中心(ATCC);DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Biological Industries公司);二甲基亚砜、BCA蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);erastin(美国MCE公司);SLC家族氨基酸转运蛋白(SLC7A11)抗体、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)4抗体、端粒重复结合因子(TRF)1抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);GAPDH抗体、TRF2抗体、HPR标记羊抗兔抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);毛细血管扩张性共济失调和Rad3相关蛋白(ATR)抗体(成都正能生物技术有限责任公司);丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司);ROS检测试剂盒(上海碧云天生物技术

有限公司);DNA提取试剂盒(中国Biomiga公司);Phi29聚合酶(美国BioLabs公司),10 mmol/L的脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);抗地高辛(anti-dig)抗体(瑞士Roche公司);CDP-star曝光液(德国Merck公司);早幼粒白血病核小体(PML)抗体(Santa Cruz Biotechnology公司);PVDF膜、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(德国Merck Millipore公司);53BP1抗体、荧光二抗(英国Abcam公司); γ -H2AX抗体(EMD Millipore公司);多聚甲醛固定液(上海生工生物);CCK8(Biosharp生物科技公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 STRING数据库 收集和整合蛋白质-蛋白质之间的相互作用关系,其中包括物理作用和功能关联,该数据库可以预测基因功能的相互作用^[15-16]。利用STRING数据库对OS易突变蛋白、铁死亡相关蛋白、端粒相关蛋白进行PPI网络构建,得到PPI网络图。网络中的节点代表基因编码的蛋白质,连线代表蛋白质-蛋白质之间的关联。

1.2.2 细胞培养与药物处理 将U2OS细胞接种于细胞培养皿中,使用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清)于37℃、5%CO₂条件下培养,当密度达到60%时,进行处理。Erastin加入182.8 μ L二甲基亚砜(DMSO),将其溶解为10 mmol/L储存液。用细胞培养液稀释为2.5 μ mol/L。后续实验均分为实验组和对照组,实验组加入2.5 μ mol/L的erastin溶液,对照组仅加入和实验组同体积的DMSO溶液。继续培养48 h,进行后续实验。

1.2.3 Western印迹 分别收集对照组和实验组的细胞,RIPA、磷酸蛋白酶抑制剂、蛋白酶抑制剂以100:2:1的比例裂解细胞并提取总蛋白。使用BCA试剂盒检测蛋白浓度。制备12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,PVDF转膜,转膜完成后,5%牛奶室温封闭2 h,加入一抗(GAPDH 1:10 000,SLC7A11 1:1 000,GPX4 1:1 000,ATR 1:1 000,TRF1 1:1 000,TRF2 1:1 000,所有一抗用TBST稀释),4℃孵育过夜,TBST漂洗3次,二抗室温孵育2 h,TBST漂洗3次,ECL显色后曝光,Image J进行定量分析。

1.2.4 MDA的检测 收集各组细胞,加入400 μ L PBS,通过液氮和37℃对样品进行两次快速冻融裂解细胞,在15 mL空白管中加入200 μ L无水乙醇,标准管中加入200 μ L 10 nmol/mL标准品,为试剂盒自带,测定管中分别加入200 μ L对照组和实验组的样品,分别加入1 mL试剂一,混匀后,分别加入3 mL试剂二和1 mL试剂三。混匀后,95℃水浴

80 min,冷却后,4 000 r/min 离心10 min,取上清 200 μ L 测定 532 nm 处的吸光度。按照说明书计算 MDA 含量。

1.2.5 ROS 的检测 在处理好的各组细胞中加入无血清培养液稀释的 DCFH-DA 探针(1:1 000),加入的体积以能充分盖住细胞为宜。阳性对照组提前 30 min 按照说明书加入阳性对照试剂。37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱孵育 30 min。用无血清培养液洗涤细胞,以去除未进入细胞内的 DCFH-DA。使用激光共聚焦显微镜观察结果,并使用 Image J 进行定量分析。

1.2.6 C-circle 的检测 收集各组细胞,使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,每个样取 30 ng。配制 20 μ L 体系。其中 10 \times buffer 和 10 mmol/L dNTP 各 2 μ L,BSA 为 0.4 μ L,样品为 1 μ L,Phi29 酶为 0.5 μ L,无菌无酶水为 14.1 μ L。混匀后,放入 PCR 仪,程序为 30 $^{\circ}$ C,8 h,65 $^{\circ}$ C,20 min,低温保存,11 $^{\circ}$ C。将样品用 2 \times SSC 溶液稀释至 180 μ L 并将样品印迹在 PVDF 膜上,上样抽干,再加入 200 μ L 2 \times SSC 上样抽干,紫外交联 2 次,预杂交 42 $^{\circ}$ C,40 min。杂交 10 h。洗去杂交液后,孵育抗体过夜(1:4 000,1 \times blocking 稀释)加入曝光液后,在化学发光成像仪中曝光,并使用 Image J 进行定量分析。

1.2.7 端粒与 PML、53BP1、 γ -H2AX 共定位的检测 处理后的各组细胞用多聚甲醛固定,0.5%Triton X-100 通透,加入端粒探针,杂交仪杂交 2 h 后,PBG 封闭 1 h。孵育 PML 抗体、53BP1 抗体、 γ -H2AX 抗体 1 h(PBG 稀释,均为 1:1 000)。PBST 洗涤 4 次,每次 5 min。孵育荧光二抗(PBG 稀释,1:2 000),PBST 洗涤 4 次,每次 5 min。分别用 70%、90%、100%乙醇脱水,各 2 min。加入 DAPI 进行封片,待其干燥后在荧光显微镜下观察结果,并使用 Image J 进行定量分析。

1.2.8 CCK8 实验 取对数生长的 U2OS 细胞接种于 96 孔板,每组设立 3 个孔,每孔 1 000 个细胞,待细胞贴壁后,进行二甲基亚砜和 erastin 处理。连续检测 5 d 细胞的生长增殖情况,每天更换新鲜的培养基 100 μ L 并加入 10 μ L 的 CCK8,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 孵育 1 h,测定细胞在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.9 克隆形成实验 取对数生长的 U2OS 细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,进行二甲基亚砜和 erastin 处理 10 d,去离子水洗涤 2 次,然后加入 4% 的多聚甲醛固定 20 min。去离子水洗涤 3 次,加入 0.5% 的结晶紫染液,静置 20 min。去离子水洗涤 3 次,每次 2 min。拍照并用 Image J 进行定量分析。

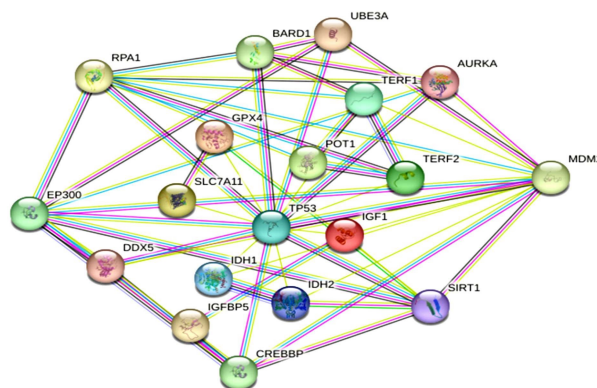
1.2.10 划痕实验 在 6 孔板的底部画 3 条平行线,用 200 μ L 枪头沿垂直于所画平行线方向划痕细胞,丢弃旧培养基并用 PBS 洗涤,加入无血清培养

基 2 mL,在显微镜下拍照,此时记录为 0 h,24 h 后在相同的位置拍照,计算每孔的愈合率。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism9 统计软件进行统计分析,符合正态分布的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有实验均已重复 3 次。根据数据类型,采用单因素方差分析或 t 检验比较不同组数据, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 铁死亡、OS 突变蛋白和端粒保护蛋白相互作用网络分析 STRING 蛋白相互作用网络分析表明,铁死亡相关的蛋白、OS 易突变蛋白和端粒保护蛋白的相互作用网络包括 RPA1、BARD1、UBE3A、AURKA、MDM2、SIRT1、CREBBP、IGFBP5、DDX5、EP300(图 1)。

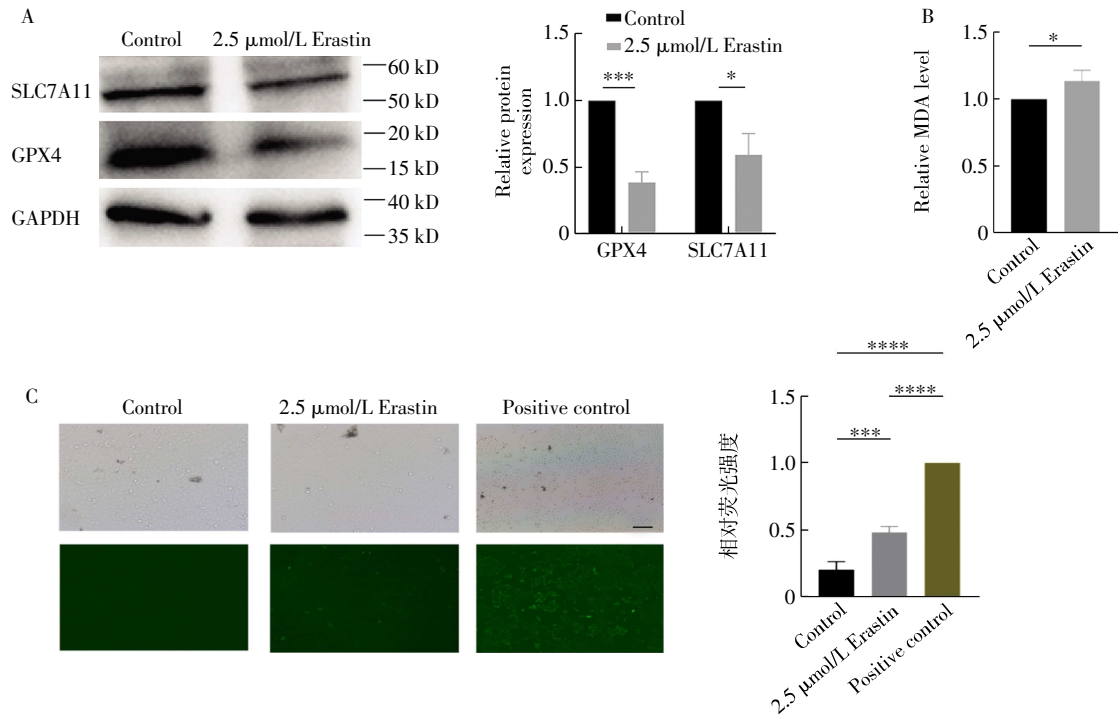


注:OS:骨肉瘤

图1 铁死亡、OS 突变蛋白、端粒保护蛋白相互作用网络分析
Fig.1 Ferroptosis, OS mutated protein, telomere protective protein interaction network analysis

2.2 Erastin 可诱导 OS 细胞发生铁死亡 Western 印迹实验结果表明,与对照组相比,2.5 μ mol/L erastin 处理后,SLC7A11、GPX4 蛋白表达量显著降低($t=4.399$ 、13.24,均 $P < 0.05$),见图 2A。与对照组相比,2.5 μ mol/L erastin 处理后,细胞内的脂质过氧化物 MDA 含量明显升高($t=2.951$, $P < 0.05$),见图 2B。与对照组相比,2.5 μ mol/L erastin 处理后,细胞内的 ROS 水平显著升高($q=11.03$, $P < 0.001$),见图 2C。

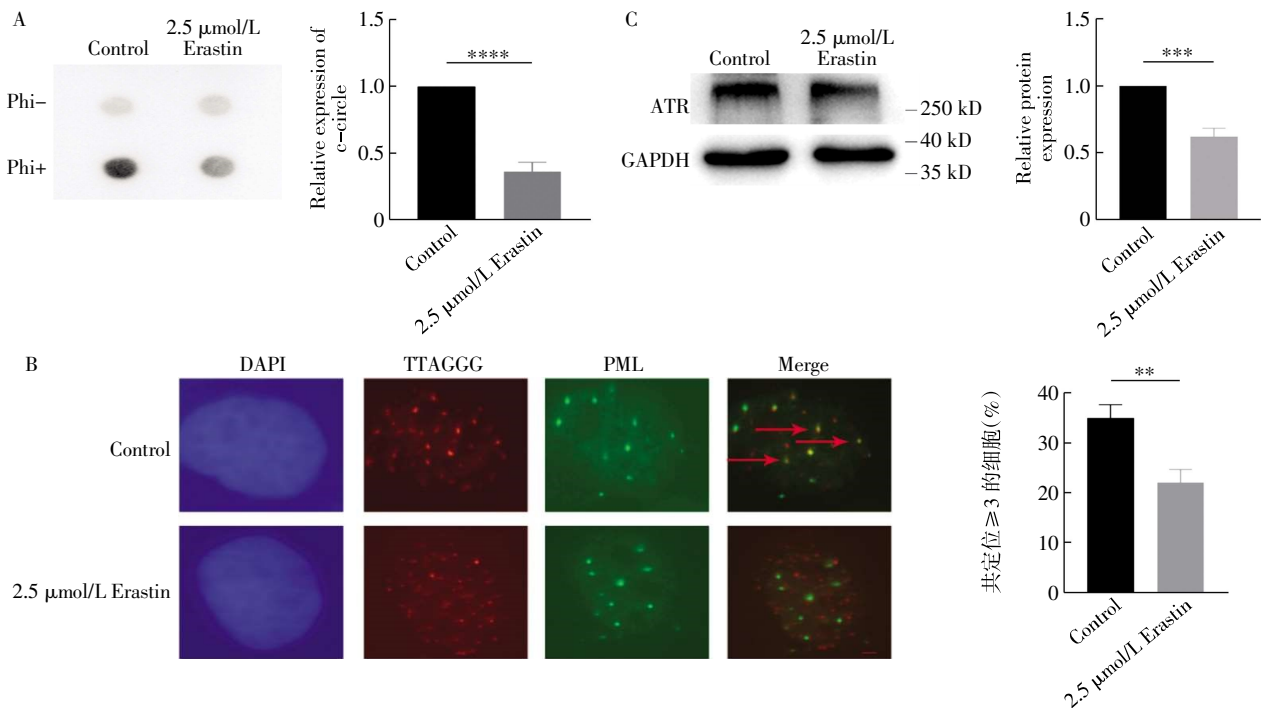
2.3 Erastin 可降低 ALT 的表型 OS 细胞分为端粒酶阳性和 ALT 阳性,U2OS 细胞为 ALT 阳性细胞,所以检测了 ALT 的表型 c-circle 和 ALT 相关 PML 体(APB)。结果表明,与对照组相比,2.5 μ mol/L erastin 处理后,c-circle 显著降低($t=16.20$, $P < 0.0001$),见图 3A,PML 与端粒的共定位显著减少($t=6.018$, $P < 0.01$),见图 3B。从蛋白层面检测 ATR 的表达情况,结果表明,与对照组相比,2.5 μ mol/L erastin 处理后,ATR 的蛋白表达明显减少($t=10.68$, $P < 0.001$),见图 3C。



注:OS:骨肉瘤;Erastin:铁死亡诱导剂;SLC7A11:SLC 家族氨基酸转运蛋白;GPX4:谷胱甘肽过氧化物酶 4;MDA:丙二醛;ROS:活性氧簇;
A:SLC7A11、GPX4 蛋白水平检测及蛋白定量分析;B:脂质过氧化物 MDA 的检测;C:ROS 的检测及定量分析,比例尺为 100 μm ;* $P<0.05$;
*** $P<0.001$;**** $P<0.0001$

图 2 Erastin 处理 OS 细胞后 SLC7A11、GPX4、MDA、ROS 的变化情况

Fig.2 Changes of SLC7A11, GPX4, MDA and ROS after erastin treatment of OS cells



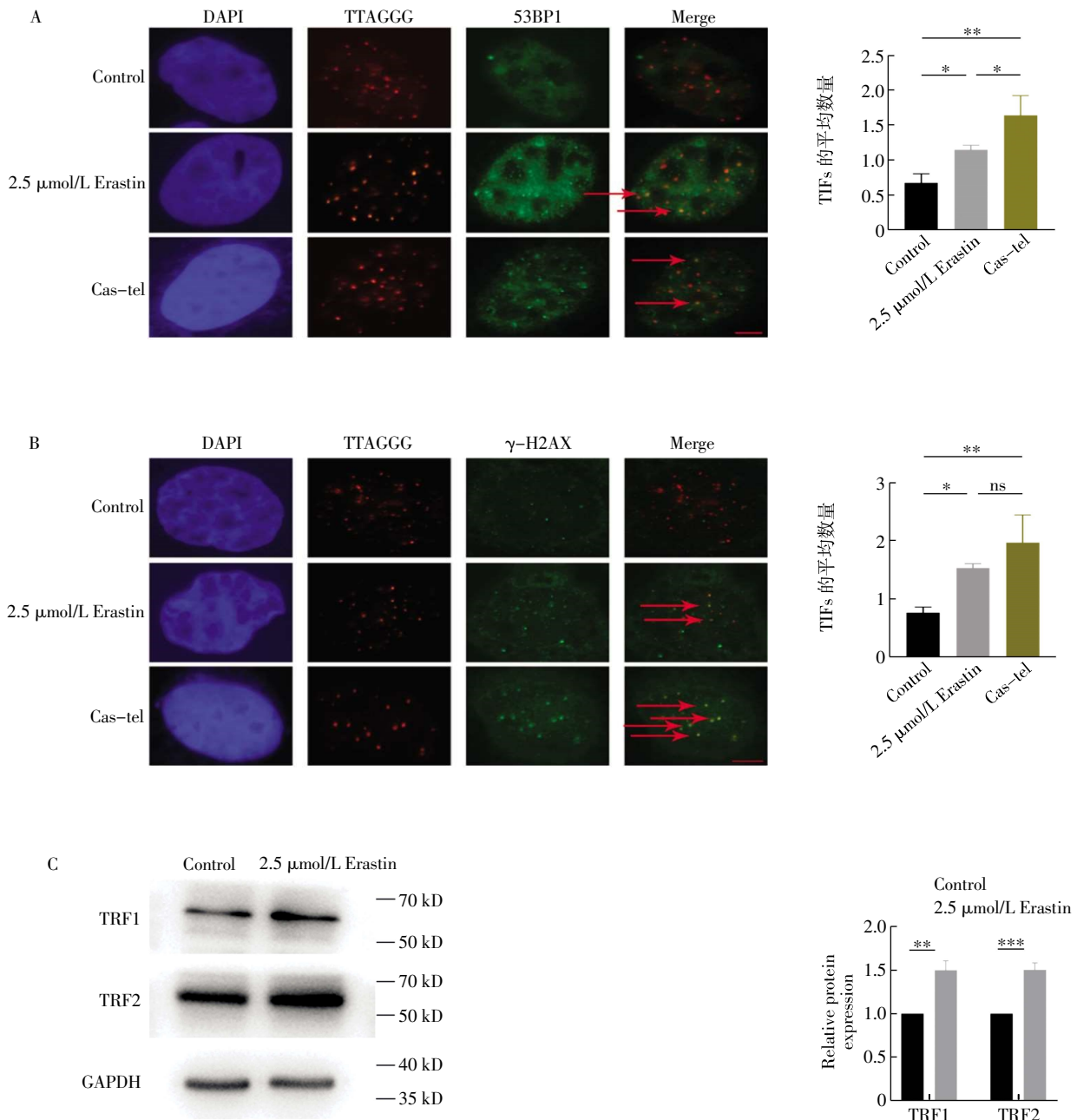
注:OS:骨肉瘤;PML 核小体:早幼粒细胞白血病核小体,ALT 细胞的显著特征,含有端粒染色质;ATR:毛细血管扩张性共济失调和 Rad3 相关蛋白;A:c-circle 水平的检测,定量分析;B:PML 小体与端粒的定位分析,定量分析每组统计 80 个细胞,其中,红色的部分代表端粒,绿色的部分代表 PML 小体,黄色的部分代表 PML 小体与端粒的定位;图中比例尺为 100 μm ;C:ATR 蛋白水平的检测及定量分析;** $P<0.01$;
*** $P<0.001$;**** $P<0.0001$

图 3 Erastin 处理 OS 细胞后,c-circle、PML 与端粒的共定位及 ATR 的变化情况

Fig.3 Changes of c-circle, telomere colocalization of PML and ATR after erastin treatment of OS cells

2.4 Erastin 可导致端粒损伤并造成端粒保护蛋白增加 通过免疫荧光和 Western 印迹检测了端粒损伤的水平 and 端粒保护蛋白 TRF1、TRF2 的变化情况。结果表明,与对照组相比,2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,端粒损伤明显增加($q=4.391, 4.653$, 均 $P<0.05$), 见图 4A、4B。TRF1、TRF2 蛋白水平明显增加 ($t=8.006, 10.79$, 均 $P<0.01$), 见图 4C。

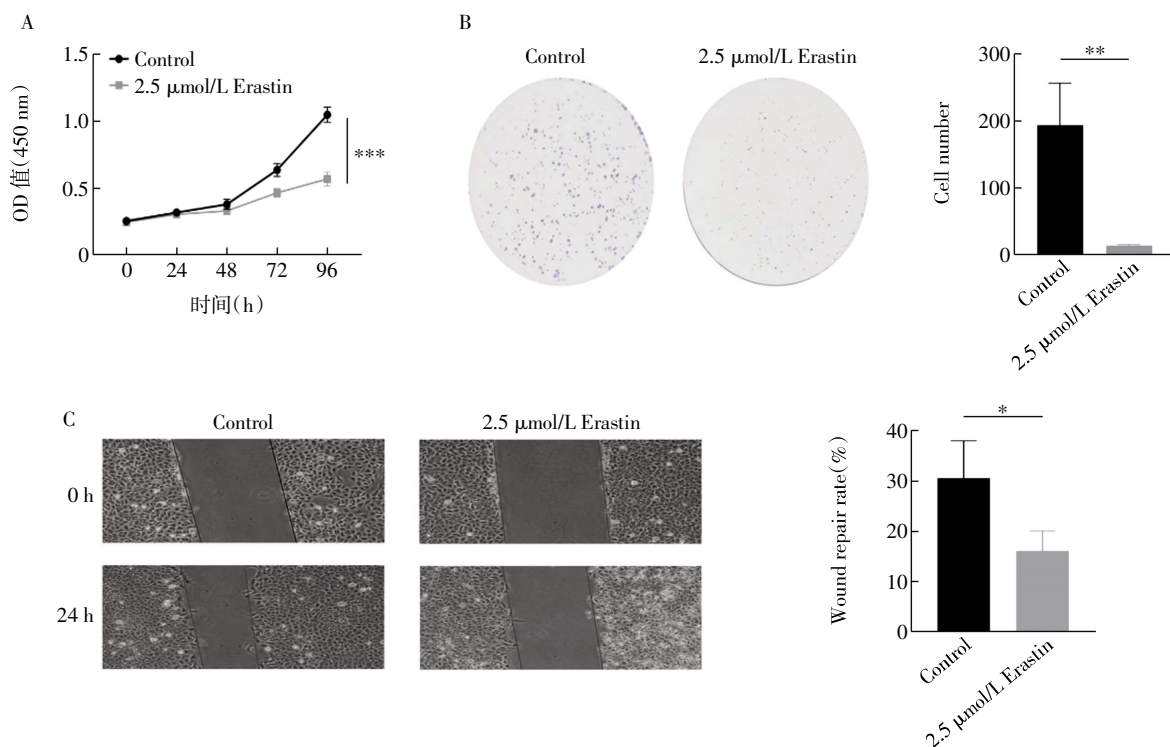
2.5 Erastin 可抑制细胞的生长增殖和迁移水平 CCK8 和克隆形成实验结果表明,与对照组相比,2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,显著抑制了细胞的生长增殖能力 ($t=10.86, 4.972$, 均 $P<0.01$), 见图 5A、5B。划痕实验结果表明,与对照组相比,2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,显著抑制了细胞的迁移水平($t=2.953, P<0.05$), 见图 5C。



注:OS:骨肉瘤;TRF1:端粒重复结合因子1;TRF2:端粒重复结合因子2;TIFs:端粒功能障碍诱发病灶;A、B:Erastin 对端粒 DNA 损伤的影响及定量分析,其中红色部分代表端粒,绿色部分代表 DNA 损伤标志物 53BP1、 γ -H2AX,黄色部分代表损伤定位于端粒;图中比例尺为 100 μm ;Cas-tel 为阳性对照组;C:TRF1、TRF2 蛋白水平的检测及定量分析;* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$;ns:无意义

图 4 Erastin 处理 OS 细胞后端粒损伤及 TRF1、TRF2 的变化情况

Fig.4 Changes of telomere damage, TRF1, TRF2 after erastin treatment of OS cells



注:A:CCK8 实验检测细胞的生长增殖能力;B:克隆形成实验检测细胞的菌落形成能力及定量分析;C:细胞迁移水平的检测及定量分析(40×);* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$

图5 Erastin 处理 OS 细胞后细胞生长、增殖、迁移的变化情况

Fig.5 Changes of the growth, proliferation and migration after erastin treatment of OS cells

3 讨论

OS 是一种罕见的骨形成肿瘤,虽然只占儿童和青少年肿瘤的 5%左右,但其死亡率却很高,并且在过去 40 年中,对 OS 的治疗并没有提高其生存率^[17]。因为 OS 缺乏特定的靶点,所以使用靶向疗法也面临挑战^[18]。治疗 OS 常见的药物为甲氨蝶呤和顺铂,尽管最初这些药物极大地改善了 OS 的预后,然而在过去几十年对于 OS 的治疗却没有取得任何进展^[19]。OS 是一种特别抗化疗的肿瘤,其只对高剂量化疗做出反应,并且很容易产生耐药性^[17]。这可能进一步解释了 OS 预后差的原因。本研究进行了蛋白互作网络分析,结果发现,OS 中常见的突变基因与铁死亡相关基因存在一定的联系。因此,本研究探索是否可以通过铁死亡的角度达到治疗 OS 的目的。

铁死亡是近年来新发现的一种细胞死亡形式,与自噬和凋亡不同,它由活性氧增加和脂质过氧化物的积累引起^[20]。已有研究发现,铁死亡与许多病理生理过程相关,包括肿瘤、神经系统疾病等^[21]。因此,诱导细胞发生铁死亡可能是一种新的肿瘤治疗策略。Erastin 是一种小分子化合物,它可以诱导细胞发生铁死亡,而且 erastin 还可以与化疗药物结合,提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[22]。所以应用 erastin 诱导 OS 细胞发生铁死亡。因为 U2OS 细胞通

过 ALT 机制延长端粒,所以本研究探索了 erastin 是否影响了 ALT 机制。

端粒通过阻止染色体融合来保持基因组的完整性。端粒的维持对肿瘤细胞的增殖至关重要^[23]。肿瘤细胞延长端粒通过两种途径,一种依赖于端粒酶,另一种为 ALT 机制。端粒酶是一种逆转录酶,它在端粒维持和肿瘤生物学中发挥重要的作用^[24]。在不存在端粒酶的情况下,肿瘤细胞通过 ALT 机制延长端粒。在人类所有肿瘤中通过 ALT 机制延长端粒约占 5%~15%,包括 OS 和胶质母细胞瘤^[25]。本研究使用的 U2OS 细胞通过 ALT 机制延长端粒。ALT 机制通过类似同源重组的方式延长端粒,研究报道,当端粒酶被抑制时,肿瘤细胞可能从端粒酶阳性转变为 ALT 阳性^[26]。目前关于 ALT 的检测方法包括 c-circle 的检测、APB 的检测、Telo-FISH 的检测,还有最近引入的全基因组测序技术。全基因组测序技术可能发展成为一种新的和有前途的 ALT 阳性肿瘤检测技术,而 c-circle 是检测 ALT 阳性的金标准^[27]。本研究通过 c-circle 和 APB 的检测发现,经过 2.5 μmol/L erastin 处理后,ALT 的表型降低。有文献报道,ALT 细胞对 ATR 抑制剂敏感^[25]。因此本研究检测了 ATR 的表达水平,结果显示经过 2.5 μmol/L erastin 处理后,ATR 的蛋白表达量降低,所以

erastin 可以降低 ALT 表型并且可以减少 ATR 的表达。目前,已有研究表明,ALT 细胞的端粒损伤和修复之间存在平衡,端粒损伤与修复的失调会导致 ALT 通路失调^[28]。本研究结果表明,经过 2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理后,53BP1、 $\gamma\text{-H2AX}$ 与端粒的共定位增加,并且 TRF1、TRF2 的蛋白表达水平增加。

本研究首先通过蛋白互作网络揭示了 OS 的发生与铁死亡、端粒存在一定的联系。使用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ erastin 处理 OS 细胞,发现 OS 细胞发生铁死亡伴随端粒的损伤、端粒保护蛋白 TRF1、TRF2 和 ALT 表型的改变,这最终抑制了 OS 细胞的生长、增殖。本研究发现了 OS 细胞经过 erastin 处理后 ALT 表型的降低和铁死亡的发生,但 erastin 是否通过影响 ALT 导致铁死亡的发生还有待确认。有研究报道,敲低 SLX4 可以升高 c-circle,增加 APB 与端粒的定位^[29],笔者后续将敲低 SLX4 增强 ALT 表型,进一步研究 ALT 与铁死亡的关系。铁死亡与 ALT 机制的关联,可能为临床 OS 的治疗提供一种新的思路。

参考文献:

- [1] CERSOSIMO F, LONARDI S, BERNARDINI G, et al. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma: from mechanisms to therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5207.
- [2] LIU Q, WANG K. The induction of ferroptosis by impairing STAT3/Nrf2/GPX4 signaling enhances the sensitivity of osteosarcoma cells to cisplatin[J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(11): 1245–1256.
- [3] SHOAIB Z, FAN T M, IRUDAYARAJ J M K. Osteosarcoma mechanobiology and therapeutic targets[J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(2): 201–217.
- [4] CHEN C, XIE L, REN T, et al. Immunotherapy for osteosarcoma: fundamental mechanism, rationale, and recent breakthroughs[J]. *Cancer Lett*, 2021, 500: 1–10.
- [5] WANG Z, YIN F, XU J, et al. CYT997 (Lexibulin) induces apoptosis and autophagy through the activation of mutually reinforced ER stress and ROS in osteosarcoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 44.
- [6] FUHRMANN D C, BRÜNE B. A graphical journey through iron metabolism, micrornas, and hypoxia in ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102365.
- [7] YAN R, XIE E, LI Y, et al. The structure of erastin-bound xCT-4F2hc complex reveals molecular mechanisms underlying erastin-induced ferroptosis[J]. *Cell Res*, 2022, 32(7): 687–690.
- [8] GEORGE S L, PARMAR V, LORENZI F, et al. Novel therapeutic strategies targeting telomere maintenance mechanisms in high-risk neuroblastoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 78.
- [9] HOANG S M, O'SULLIVAN R J. Alternative lengthening of telomeres: building bridges to connect chromosome ends[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(3): 247–260.
- [10] ZHANG J M, ZOU L. Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks[J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 30.
- [11] GUH C Y, SHEN H J, CHEN L W, et al. XPF activates break-induced telomere synthesis[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 5781.
- [12] FU J, LI T, YANG Y, et al. Activatable nanomedicine for overcoming hypoxia-induced resistance to chemotherapy and inhibiting tumor growth by inducing collaborative apoptosis and ferroptosis in solid tumors[J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120537.
- [13] CHEN M, JIANG Y, SUN Y. KDM4A-mediated histone demethylation of SLC7A11 inhibits cell ferroptosis in osteosarcoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 550: 77–83.
- [14] MEAZZA C, SCANAGATTA P. Metastatic osteosarcoma: a challenging multidisciplinary treatment[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016, 16(5): 543–556.
- [15] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D638–D646.
- [16] VON MERING C, HUYNEN M, JAEGER D, et al. STRING: a database of predicted functional associations between protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 258–261.
- [17] LILIENTHAL I, HEROLD N. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: a review of current and future strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6885.
- [18] CORRE I, VERRECCHIA F, CRENN V, et al. The osteosarcoma microenvironment: a complex but targetable ecosystem[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 976.
- [19] YAHIRO K, MATSUMOTO Y. Immunotherapy for osteosarcoma[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17(5): 1294–1295.
- [20] MOU Y, WANG J, WU J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [21] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: past, present and future[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.
- [22] ZHAO Y, LI Y, ZHANG R, et al. The role of erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5429–5441.
- [23] BEJARANO L, BOSSO G, LOUZAME J, et al. Multiple cancer pathways regulate telomere protection[J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(7): e10292.
- [24] SANDIN S, RHODES D. Telomerase structure[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2014, 25(100): 104–110.
- [25] FLYNN R L, COX K E, JEITANY M, et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors[J]. *Science*, 2015, 347(6219): 273–277.
- [26] LEE J J, LEE J, LEE H. Alternative paths to telomere elongation[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 113: 88–96.
- [27] SUN H, CHEN G, GUO B, et al. Potential clinical treatment prospects behind the molecular mechanism of alternative lengthening of telomeres (ALT)[J]. *J Cancer*, 2023, 14(3): 417–433.
- [28] HOU K, YU Y, LI D, et al. Alternative lengthening of telomeres and mediated telomere synthesis[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(9): 2194.
- [29] SOBINOFF A P, ALLEN J A, NEUMANN A A, et al. BLM and SLX4 play opposing roles in recombination-dependent replication at human telomeres[J]. *EMBO J*, 2017, 36(19): 2907–2919.

(2023-10-29 收稿)