

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.006

铁死亡在结直肠癌再生细胞放疗抵抗中的作用及其可能的机制

常钰涵, 戈雨桐, 哈文韬, 魏晓为, 龚涌灵(南京医科大学附属南京医院暨南京市第一医院 肿瘤科, 江苏 南京 210006)

[摘要] **目的:** 探讨铁死亡在结直肠癌再生细胞放疗抵抗中的功能和机制。**方法:** 采用二维常规条件培养结肠癌HCT116细胞(Control细胞), 同时通过机械力方法在三维纤维蛋白软胶中培养并筛选出具有高致瘤能力的肿瘤再生细胞(TRC); 用不同剂量(2、4、6、8 Gy)的X-射线照射Control细胞和TRC, 并通过MTS、细胞克隆实验分别检测各组细胞的存活率和增殖能力; Control细胞和TRC在采用铁死亡诱导剂(Erastin)和X-射线分别处理后, 用C11-BODIPY试剂进行染色, 通过共聚焦显微镜和流式细胞术观察并测定细胞的脂质过氧化水平。用qPCR法检测X-射线照射、Erastin处理对Control细胞和TRC中铁死亡相关基因谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)和酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)表达的影响, 用WB法检测对细胞中铁死亡相关蛋白GPX4、ACSL4表达的影响。**结果:** 从纤维蛋白软胶中培养并筛选出高干性的TRC; 用不同剂量(2、4、6、8 Gy)的X-射线照射后, Control细胞存活率较TRC显著降低($P < 0.05$), 且Control细胞的克隆大小和数量较TRC显著降低(均 $P < 0.05$); Control细胞采用不同剂量X-射线(4、8 Gy)照射及用Erastin处理后, X-射线处理组细胞脂质过氧化水平较未处理组细胞显著升高($P < 0.05$), Erastin处理组细胞脂质过氧化水平较DMSO处理组细胞显著升高($P < 0.05$), 而TRC各处理组间无显著差异(均 $P > 0.05$)。机制研究发现, TRC中GPX4和ACSL4在铁死亡诱导条件(X-射线照射或Erastin处理)下较Control细胞呈现出有助于抵抗的表达模式, 即GPX4持续上调、ACSL4持续下调, 且表现为Erastin剂量依赖性。**结论:** 结直肠TRC可能通过高表达GPX4、低表达ACSL4来抵抗铁死亡, 从而抵抗放疗。

[关键词] 结直肠癌; 肿瘤再生细胞; 放疗抵抗; 铁死亡; 谷胱甘肽过氧化物酶4; 酰基辅酶A合成酶长链家族成员4

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)05-0426-08

Function and mechanism of ferroptosis in the radiation resistance of colorectal tumor-repopulating cells

CHANG Yuhan, Ge Yutong, HA Wentao, WEI Xiaowei, GONG Yongling (Department of Oncology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, 210006, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the function and mechanism of ferroptosis in the radiation resistance of colorectal tumor-repopulating cells. **Methods:** Human colorectal tumor cells HCT116 (defined as Control cells) were cultured in two-dimensional normal conditions, and tumor regenerative cells with high tumorigenicity (defined as TRCs) were cultured and screened in three-dimensional fibrin soft gels by the mechanical force method. Both the control group and TRC group cells were exposed to X-rays with different doses (2, 4, 6, 8 Gy) and MTS and the clone formation assay were used to measure the cell viability rate and proliferation ability. After the Control cells and TRCs were treated with ferroptosis inducer (Erastin) and X-rays respectively, they were stained with C11-BODIPY reagent, and the lipid peroxidation level of the cells was observed and determined by confocal microscopy and flow cytometry. qPCR was used to determine the effects of Erastin and X-rays treatments on the expressions of ferroptosis-related genes glutathione peroxidase 4 (GPX4) and acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) in the Control cells and TRCs; WB assay was performed to determine the effects on the expressions of ferroptosis-related proteins GPX4 and ACSL4. **Results:** Colorectal TRCs with high stemness were cultured and screened out from soft fibrin gels. After irradiation with different doses (2, 4, 6, 8 Gy) of X-rays, the viability rate, the clone size and the number of clones in the control group were significantly lower than those in the TRC group (all $P < 0.05$). After the cells in the control group were irradiated with different doses of X-rays (4, 8 Gy) and treated with Erastin, the lipid peroxidation level of the cells in the X-ray treated group was significantly higher than that in the untreated group ($P < 0.05$). The lipid peroxidation level of the cells in the Erastin-treated group was significantly higher than that in the DMSO-treated

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81773240)

[作者简介] 常钰涵(1996—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤干细胞的恶性进展相关研究, E-mail: changyh7967@163.com

[通信作者] 龚涌灵, E-mail: 18915953828@163.com

group ($P < 0.05$). There was no statistical difference among all treatment subgroups in the TRC group (all $P > 0.05$). The mechanism study indicated that compared with those in control cells, GPX4 and ACSL4 in TRCs under ferroptosis-inducing conditions (X-ray radiation and Erastin treatment) presented expressions that contributed more to radiation resistance, i.e., continued upregulation of GPX4 and downregulation of ACSL4 and their expressions were dependent on the doses of Erastin. **Conclusion:** Colorectal TRCs may resist ferroptosis through a high expression of GPX4 and a low expression of ACSL4, which in turn induces radiation resistance.

[Key words] colorectal cancer; tumor-repopulating cell (TRC); radiation resistance; ferroptosis; glutathione peroxidase 4 (GPX4); acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4 (ACSL4)

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(5): 426-433. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.006]

随着人口老龄化和生活方式的改变,近年来中国结直肠癌发病率明显上升,已成为严重威胁人民生命和健康的主要疾病之一。放疗在结直肠癌治疗策略中具有十分重要的地位^[1-2],然而肿瘤细胞放疗抵抗往往导致临床治疗失败,最终影响结直肠癌患者的生活质量与生存^[3]。探索肿瘤放疗抵抗机制对于提升结直肠癌整体治疗效果具有重要的转化意义。肿瘤干细胞参与肿瘤放疗抵抗的发生,但由于肿瘤微环境的高度异质性以及传统鉴定方法的局限性,肿瘤干细胞应激防御特征与机制目前尚未完全阐明^[4-5]。优化肿瘤干细胞模型、揭示固有放疗抗性的形成一直是肿瘤治疗抵抗研究领域的难点与热点,对提升结直肠癌临床疗效十分关键。基于上述认识,本课题组利用一种新型肿瘤干细胞样细胞模型——肿瘤再生细胞(tumor regenerative cell, TRC)模型探索结直肠癌放疗抵抗机制,并在研究内容方面聚焦一种新型细胞死亡形式——铁死亡,通过结合分子生物学、力学与生物材料的技术研究 TRC 是否通过抵抗铁死亡进而抵抗放疗,探讨 TRC 铁死亡抵抗与放疗敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要材料

人结肠癌细胞 HCT116 购自中国科学院细胞库。McCoy's 5A 培养基、胎牛血清、双抗、Dispase II、0.45 μm PVDF 膜、ECL 化学发光试剂均购自默克公司,纤维蛋白原(salmon fibrinogen)、凝血酶(salmon thrombin)均购自 Searun Holdings 公司,胰酶替代物、Lipofectamine 2000、C11-BODIPY 试剂、TRIzol 试剂均购自美国赛默飞公司,Erastin、Deferasirox (Fe^{3+} chelate)均购自 MedChemExpress 公司,胰蛋白酶、无血清细胞冻存液均购自苏州新赛美生物科技有限公司,GoTaq[®] 1-Step RT-qPCR System 一步法检测试剂盒、MTS 试剂盒均购自 Promega 公司,BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液均购自上海碧云天生物技术有限公司,预制蛋白胶购自南京金斯瑞生物科技有限公司,山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗均购自 Proteintech 公司,谷胱甘

肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体购自 Abcam 公司,酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 抗体、 β -Tubulin 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养与三维纤维蛋白软胶的制备

用含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养结肠癌细胞 HCT116。取对数生长期的细胞用来做后续实验。Control 细胞为常规培养的结肠癌 HCT116 细胞,TRC 为三维蛋白软胶筛选并培养出的 HCT116 细胞。参照文献^[6-7],当纤维蛋白原浓度为 1 mg/mL 时,对应硬度约为 90 Pa。根据实验要求,选择不同硬度的纤维蛋白软胶(1、1.5、2 mg/mL),配置含纤维蛋白原和 T7 缓冲液的细胞混合液,将混合液和凝血酶加入细胞培养板中,在细胞培养箱中静置 30 min 后补充培养基。次日开始观察 TRC 形态、大小是否均一。

1.3 制备 TRC 单细胞悬液

将母液浓度为 100 mg/mL 的 Dispase II 溶胶酶稀释到 2 mg/mL 的工作浓度,在 24 孔板的每孔中加入 200 μL Dispase II,静置 5 min 直至没有固态凝胶。将所有细胞悬液吸出,加入进 15 mL 离心管,离心力为 219 $\times g$,离心 3 min;弃上清,加入 3~5 mL 胰酶替代物重悬细胞沉淀,反复吹打后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中 5 min,重复操作直至在显微镜下观察细胞克隆离散成单细胞,获得 TRC 单细胞悬液。

1.4 qPCR 实验

用 TRIzol 法分别从 Control 和 TRC 细胞中分离提取总 RNA,用 Nanodrop 仪器检测总检测样品的 RNA 浓度。根据 Promega 一步法逆转录 qPCR 试剂盒的说明书配置溶液;设置 qPCR 反应程序,并使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量算法分析结果。qPCR 实验中所使用的引物序列见表 1。

1.5 MTS 法检测 X-射线照射对 TRC 增殖的影响

将 Control 和 TRC 分别接种在 96 孔板中,每孔 8×10^2 个细胞,培养 48 h 后用 X-射线照射,放回细胞培养箱培养 48 h。根据 Promega 试剂盒的要求加入 MTS 试剂处理 2 h,于酶标仪下检测 490 nm 波长的光

密度(D)值。计算细胞存活率,细胞存活率=实验组 D 值/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

表1 qPCR引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
GPX4	R: CCCGATACGCTGAGTGTGGTT F: TCTTCGTTACTCCCTGGCTCCT
ACSL4	R: CCAAGTAGACCAACGCCTTCAG F: TTCGGTCCCAGTCCAGGTATTC
CD44	R: CGAAGAAGGTGTGGGCAGAAGA F: CCGTTGAGTCCACTTGGCTTTC
BMI1	R: TGTGTGCTTTGTGGAGGGTACT F: TTGCTGGTCTCCAGGTAACGAA
TWIST1	R: TTCCTCTACCAGGTCCTCCAGA F: CTCCATCCTCCAGACCGAGAAG
SOX17	R: GGACCGCACGGAATTTG F: GAGGCCCATCTCAGGCTTG
PTPRT	R: GGAGAAGTGGCAGGAGCAGTAT F: GCAGATGGCACAGAAGGTTC
GATA6	R: CTCAGTTCCTACGCTTCGCAT F: GTCGAGGTCAAGTGAACAGC
CK7	R: GCTGAAGAAGGATGTGGATGCT F: GCTCTGTCAACTCCGTCTCATT

1.6 WB实验检测TRC中GPX4、ACSL4的表达

将Control细胞和TRC接种在细胞培养板中,72 h收集细胞并提取总蛋白,使用BCA法进行蛋白定量。按照预制胶操作要求进行SDS-PAGE后转移至PVDF膜,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。用TBST洗膜3次后,分别加入抗 β -tublin、GPX4、ACSL4一抗(均按照1:1 000稀释)4 $^{\circ}$ C过夜。用TPST洗膜3次,加入相应的二抗(按照1:8 000稀释)常温处理1 h,再次用TBST洗膜3次,按照1:1配置ECL发光液,用凝胶成像系统进行曝光,最后使用ImageJ软件分析条带的灰度值,计算处理结果。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带的灰度值/内参的条带灰度值。

1.7 克隆形成实验检测TRC的放射敏感性

将Control细胞和TRC接种在细胞培养板中培养24 h,给予不同剂量的X-射线照射(2、4、6、8 Gy)后,放回细胞培养箱培养48 h,收集单细胞悬液,根据辐照梯度的不同剂量,按照梯度倍数稀释的方法稀释Control和TRC细胞,接种到6 cm细胞培养皿中,每个实验条件设置3个复孔,培养2周。定时观察培养皿中的细胞克隆,当出现肉眼可观察到的克隆之后终止培养。在PBS清洗3次且用甲醛固定细胞后,加入适量的结晶紫染剂进行染色。细胞幸存指数=(处理组克隆形成数/处理组接种细胞数)/

Control组克隆形成率 $\times 100\%$;Control组克隆形成率=(Control组克隆形成数/Control组接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.8 共聚焦显微镜观察TRC的铁死亡水平

将Control细胞和TRC接种在细胞培养板中培养48 h,在用不同梯度的X-射线(4、8 Gy)照射后,放回细胞培养箱培养48 h。预先制备C11-BODIPY和Hoechst染色液,每个样品所需的染色液体积对应于用于培养细胞的培养基体积。用PBS清洗3次并加入染液,在细胞培养箱处理15 min后,避光条件下用PBS快速冲洗3次,用共聚焦显微镜进行拍摄。

1.9 流式细胞术检测TRC的脂质过氧化水平

取出培养了48 h的Control细胞和TRC,分别用Erastin和不同剂量的X-射线(4、8 Gy)处理48 h,PBS清洗3次,加入预先制备的2 μ mol/L工作浓度的C11-BODIPY染色液,在细胞培养箱处理30 min,PBS清洗3次,将Control细胞和TRC制备成单细胞悬液并转移到离心管中,离心力为219 $\times g$ 离心3 min,收集细胞沉淀。重悬细胞,并将细胞悬液通过400目的网筛进入流式管中。用流式细胞仪检测细胞脂质过氧化水平。每个条件至少获得 1×10^4 个细胞颗粒。

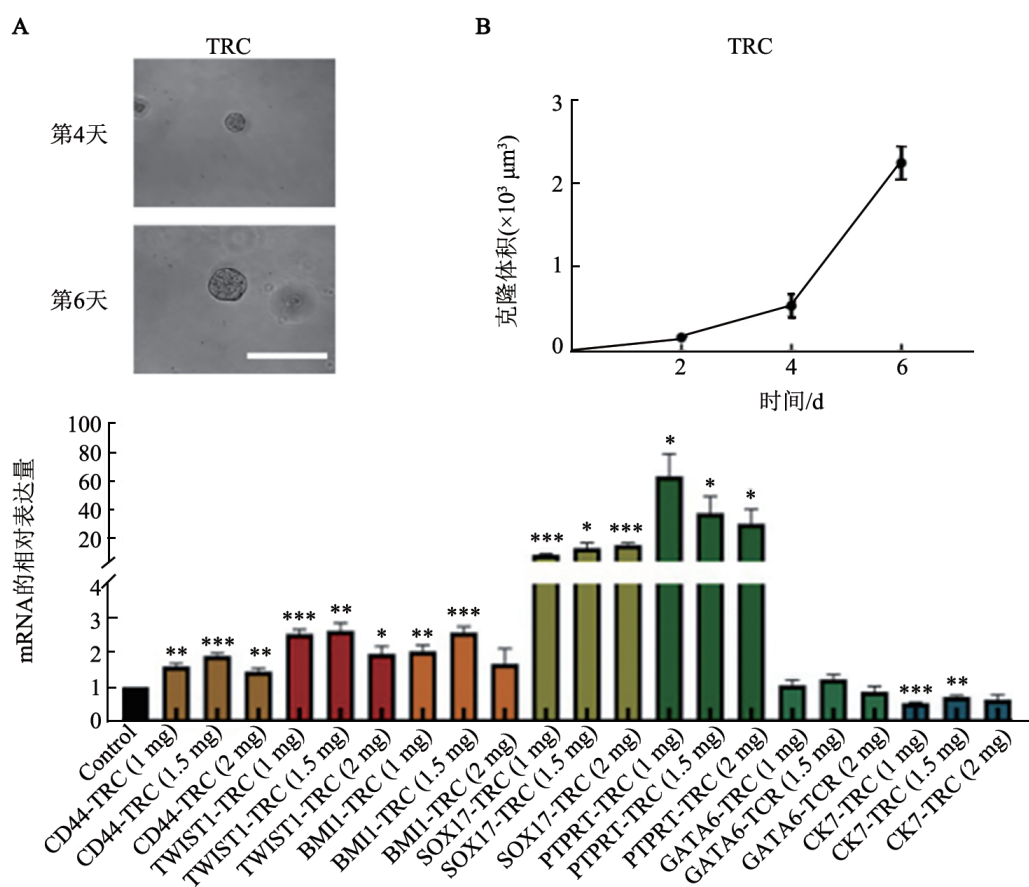
1.10 统计学处理

采用SPSS20.0软件处理数据。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验分析,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纤维蛋白软胶筛选的TRC具有高干性和基质硬度依赖性

将结肠癌细胞HCT116培养在90 Pa的三维纤维蛋白软胶中6 d,筛选出TRC(图1A),在90 Pa的纤维蛋白软胶中,TRC展现出了良好的形态和旺盛的增殖能力(图1B)。在第6天提取HCT116细胞的总mRNA,通过对干性基因CD44、SOX2、TWIST、NANOG、SOX17、BMI1、PTPRT以及分化基因GATA6、CK7等进行qPCR检测,结果(图1C)表明,结直肠TRC呈现出大量干性基因高表达且分化基因低表达的分子模式;且随纤维蛋白软胶的硬度(1、1.5、2 mg/mL)改变,干性基因和分化基因的表达呈现基质硬度依赖性。以上数据证实,三维基质胶筛选出的TRC为结直肠癌干性细胞,可作为结直肠癌干性细胞研究模型。本研究以状态更为稳定的HCT116培养的Control细胞和TRC为研究主体展开后续功能及机制研究。



与 Control 细胞相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

A: 结直肠癌 TRC 克隆图片, 比例尺为 $200 \mu\text{m}$; B: 结直肠癌 TRC 克隆体积; C: 与 Control 细胞相比, TRC 细胞干性基因及分化基因的相对表达水平

图1 纤维蛋白软胶筛选 TRC 具有高干性和基质硬度依赖性

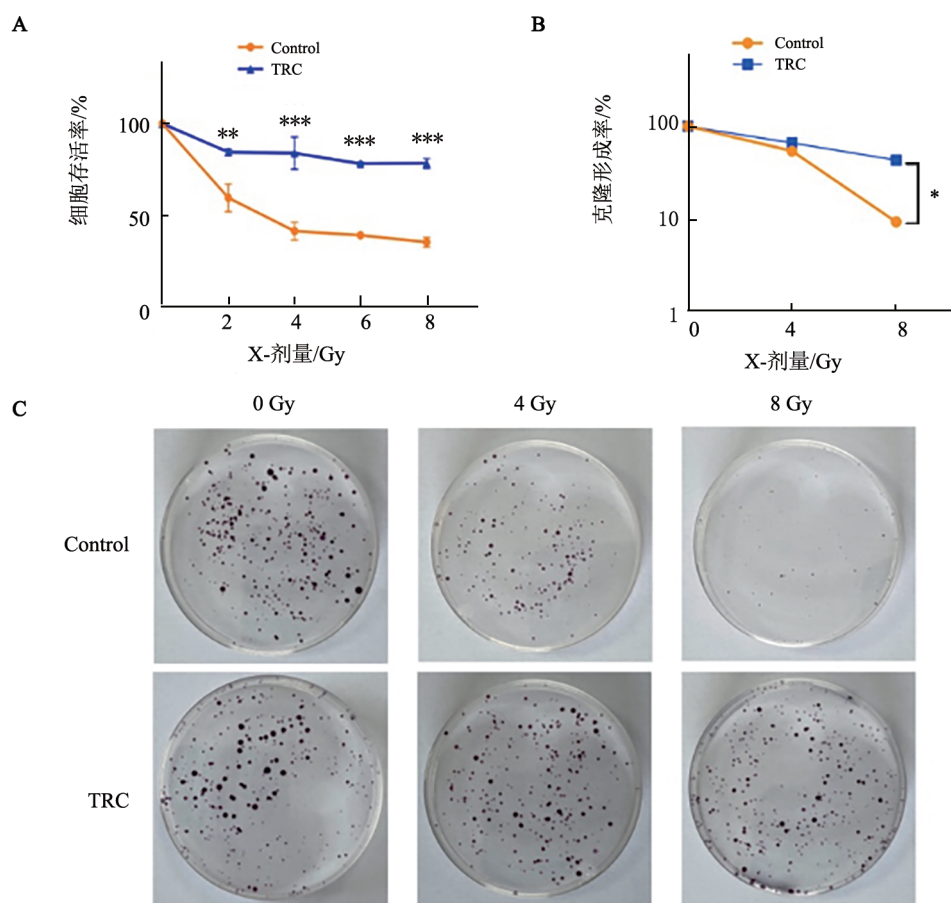
2.2 结直肠癌 TRC 具有较高水平的放疗抵抗

为了检测 Control 细胞和 TRC 对放疗的耐受水平, 用不同剂量的 X-射线 (2、4、6、8 Gy) 照射细胞, MTS 法检测结果 (图 2A) 显示, TRC 细胞的细胞存活率均显著高于 Control 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。克隆形成实验结果 (图 2B、C) 表明, 在经过不同剂量的辐照 (0、4、8 Gy) 后, TRC 的克隆数量较 Control 细胞显著升高, TRC 的细胞幸存指数均高于 Control 细胞 (均 $P < 0.05$)。以上数据表明, TRC 的放疗抵抗能力远强于 Control 细胞。

2.3 结直肠癌 TRC 的放疗抵抗与脂质过氧化密切相关

为了探索结直肠癌 TRC 产生放疗抵抗潜在的机制, 检测铁死亡与 TRC 放疗抵抗的相关性。脂质过氧化是发生铁死亡的重要标志, 当用 C11-BODIPY 标定脂质过氧化时, 红色荧光为还原态, 绿色荧光为氧化态。本研究用 C11-BODIPY 对样品进行染色以检测不同处理组细胞的脂质过氧化水平, 分别采用共聚焦显微镜和流式细胞术观察并标定其铁死亡水平。共聚焦显微镜下观察的结果 (图 3A、B) 表明, 在

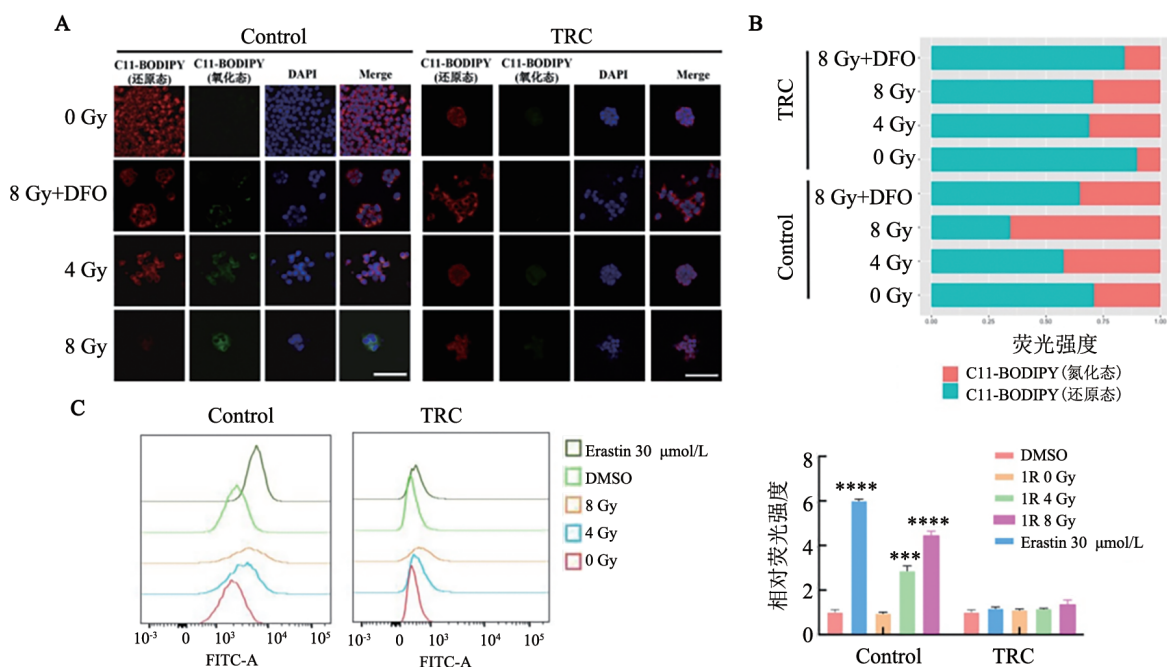
经过 X-射线 (4、8 Gy) 照射后, 与 0 Gy 组 Control 细胞相比, 4、8 Gy 组 Control 细胞的绿色荧光更强, 发生了脂质过氧化, 并且随 X-射线剂量的增加, Control 细胞的绿色荧光水平也升高; 而观察单个 TRC 克隆发现, 各组 TRC 几乎没有绿色荧光, 表现出了 X-射线抵抗。用铁螯合剂 Deferasirox (Fe^{3+} chelate) (DFO) 和 8 Gy 射线联合处理后, 结果显示, Control 细胞因辐射产生的脂质过氧化被逆转, 而 TRC 无明显改变。另外, C11-BODIPY 染色 (以 $30 \mu\text{mol/L}$ Erastin 处理组作为阳性对照) 后通过流式细胞术检测发现, 与 DMSO 组相比, 经过 Erastin 处理后的 Control 细胞发生了明显的脂质过氧化 ($P < 0.05$), 而 TRC 没有发生脂质过氧化 ($P > 0.05$); Control 细胞在经过不同剂量的辐照后 (4、8 Gy), 和 0 Gy 组相比, 4、8 Gy 辐照处理组的细胞发生了更高水平的脂质过氧化 (均 $P < 0.05$), 而 TRC 各组的脂质过氧化水平没有发生显著改变 (均 $P > 0.05$) (图 3C)。这些结果表明, 结直肠癌 TRC 的放疗抵抗与脂质过氧化密切相关, 其可能通过抵抗铁死亡来抵抗放疗。



与Control细胞相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

A: 不同剂量X射线处理后, TRC的存活率均显著高于Control细胞(MTS法检测); B, C: 不同剂量X射线处理后, TRC的克隆形成率均显著高于Control细胞(克隆形成实验结果及数据统计)

图2 结肠癌TRC抵抗放疗水平高于Control细胞



与DMSO组相比, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

A: 共聚焦显微镜标定脂质过氧化水平, 红色表示还原态, 绿色为氧化态, 标尺100微米; B: 共聚焦显微镜标定脂质过氧化水平的荧光值定量分析; C: 流式细胞术检测脂质过氧化水平及定量分析

图3 结直肠癌TRC的放疗抵抗与脂质过氧化密切相关

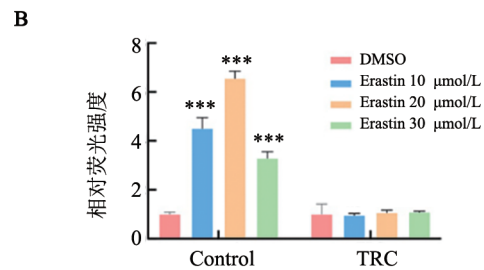
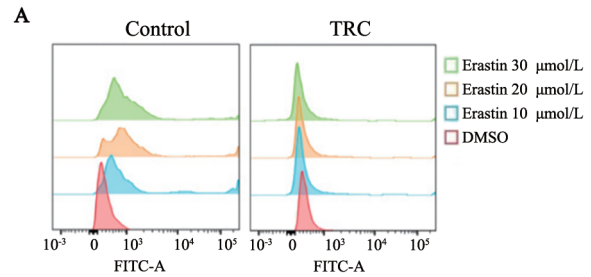
2.4 结直肠癌 TRC 可能通过抵抗铁死亡参与其放疗抵抗

为了进一步检测结直肠癌 TRC 对铁死亡的抵抗, 本研究对细胞行不同浓度铁死亡诱导剂 Erastin 处理(实验组), 用 C11-BODIPY 对样品进行染色, 通过流式细胞术检测其铁死亡发生的水平, 实验结果(图 4A、B)表明, 在不同浓度的 Erastin 处理下, Control 细胞的实验组脂质过氧化水平显著高于对照组($P < 0.05$), 但没有观察到浓度依赖性; 各组 TRC 脂质过氧化水平之间的差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明结直肠癌 TRC 显著抵抗铁死亡。因此推测, 结直肠癌 TRC 可能通过抵抗铁死亡参与其放疗抵抗。

2.5 结直肠癌 TRC 可能通过高表达 GPX4 和低表达 ACSL4 抵抗铁死亡

为了进一步探索结直肠癌 TRC 抵抗铁死亡的分子机制, 本研究检测了结直肠癌 TRC 中铁死亡关键调控分子 GPX4 和 ACSL4 的表达水平。在细胞培养的第 6 天收取 Control 细胞和 TRC 样品的总 RNA, qPCR 法检测结果(图 5A)表明, 与 Control 细胞相比, TRC 高表达 GPX4、低表达 ACSL4(均 $P < 0.05$); 在细胞培养的第 6 天收取 0 Gy 或 8 Gy 处理组的 Control 细胞和 TRC 总蛋白, WB 法检测结果(图 5B、C)表明, 经 8 Gy 射线处理后, Control 细胞的 ACSL4 蛋白相对表达水平升高, GPX4 相对表达水平下降, 而 TRC 与之相反(均 $P < 0.05$); 在细胞培养的第 6 天收取不同浓度的 Erastin 处理后(实验组)的 Control 和 TRC 细胞总蛋白, WB 法检测结果(图 6)证实,

与 DMSO 组相比, 实验组 Control 细胞低表达 GPX4、高表达 ACSL4, TRC 则与之相反(均 $P < 0.05$); 相比 Control 细胞的实验组, TRC 的实验组高表达 GPX4、低表达 ACSL4, 并且随着 Erastin 的浓度升高, GPX4 的表达量升高, ACSL4 的表达量随之降低(均 $P < 0.05$)。这些数据提示, 结直肠癌 TRC 在铁死亡诱导条件下, 可能通过高表达 GPX4 和低表达 ACSL4 抵抗铁死亡。

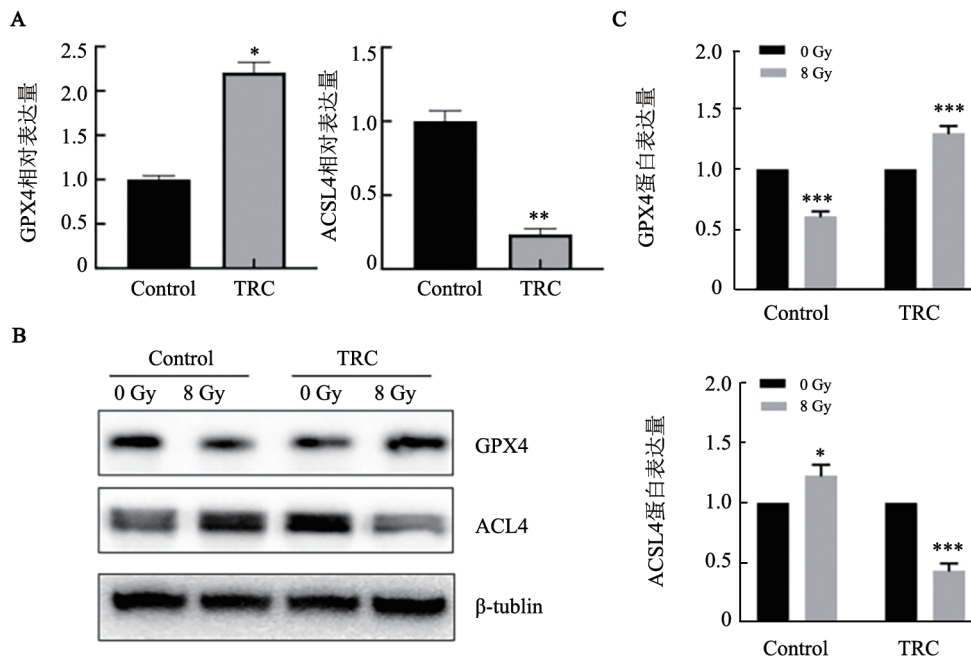


与 DMSO 组相比, $***P < 0.001$

A: 流式细胞术检测 Erastin 诱导的脂质过氧化水平;

B: C11-BODIPY 染色相对荧光强度

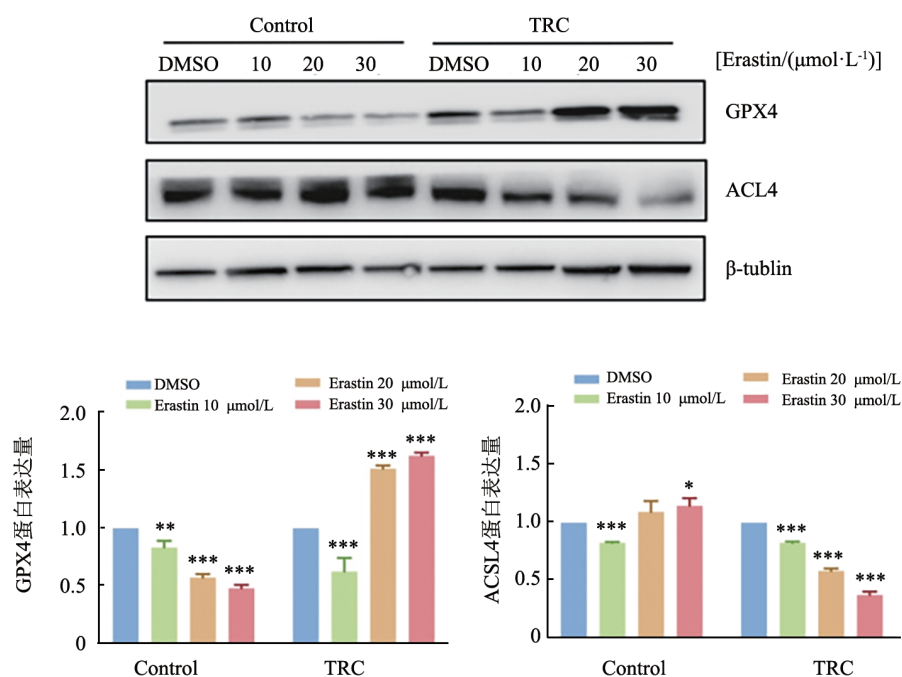
图 4 结直肠癌 TRC 可能通过抵抗铁死亡参与其放疗抵抗



与 Control 细胞相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

A: 基因 GPX4 和 ACSL4 的相对表达量; B: GPX4、ACSL4 蛋白表达水平; C: GPX4、ACSL4 蛋白表达水平的定量分析

图 5 结直肠癌 TRC 可能通过高表达 GPX4 和低表达 ACSL4 抵抗铁死亡



与DMSO组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图6 结直肠癌TRC可能通过高表达GPX4和低表达ACSL4抵抗铁死亡

3 讨论

结直肠癌是较为常见的消化道恶性肿瘤之一,放射治疗作为其重要的治疗方式,被广泛推荐应用于T3期以上或淋巴结转移且无全身转移的中晚期直肠癌患者的治疗^[8],其主要模式为新辅助/辅助治疗、根治性治疗、转化性治疗和姑息治疗^[9]。但是放疗的疗效并不理想,仅有1/3的患者对放疗相对敏感,甚至有些患者会出现放疗抵抗^[10]。因此,确定放疗抵抗的原因及其分子机制对于优化结直肠癌患者的治疗方案至关重要。

目前的研究结果多支持结直肠肿瘤干细胞是结直肠癌治疗抵抗和疾病复发的根源,常规疗法通常针对增殖和成熟的肿瘤细胞,而结直肠肿瘤干细胞大多处于静止状态且分化较差,因此容易在放化疗的损伤中存活^[11]。2012年,LIU等^[6]基于细胞外基质的物理特性对细胞干性及转化的调控研究^[7]结果,在硬度约为90 Pa的三维纤维蛋白软胶中培养并筛选出了具有高致瘤能力的TRC,其能够驱使肿瘤形成和转移。本研究在纤维蛋白软胶中筛选和培养出具有高致瘤能力、高干性的结直肠癌TRC,进一步通过MTS法及克隆形成实验证实了TRC经放疗后仍具有良好的细胞增殖能力,相较于常规培养的细胞能有效抵抗放疗损害,这与DAS等^[11]的发现一致。

目前,TRC通过何种机制发挥其放疗的抵抗作用仍不明确,本研究的结果数据表明,结直肠癌TRC可能通过抵抗铁死亡参与其放疗抵抗。铁死亡是一

种铁离子依赖性的、以细胞内ROS堆积为主要特征的非凋亡性细胞坏死^[12],能够促进肿瘤细胞对治疗的抵抗^[13]。GPX4能够利用谷胱甘肽将过氧化的脂质还原成无毒的脂醇,从而抵抗铁死亡,这也是细胞抵抗铁死亡的重要机制之一^[14]。因此,细胞可能通过高表达铁死亡的负调控因子GPX4从而抵抗放疗^[15]。另外,ACSL4能够将游离脂肪酸转化为铁死亡所需的脂酰CoA,从而驱动铁死亡^[12,16-18]。放疗会通过上调ACSL4的表达促进铁死亡所需的重要中间产物的生物合成^[19],因此缺失ACSL4的细胞能够显著抵抗GPX4抑制诱导的铁死亡^[20]。在此基础上,本研究发现,与Control细胞相比,TRC中GPX4呈高表达、ACSL4呈低表达,并且随着Erastin的浓度升高,GPX4的表达量升高、ACSL4的表达量降低。这些数据都提示了TRC具有天然抵抗铁死亡的潜能。功能实验也证实,放疗诱发了结直肠癌细胞的铁死亡以及TRC的铁死亡抵抗。

综上所述,本研究通过模拟肿瘤细胞在体内真实的物理生存环境,建立具有干性的结直肠癌TRC模型,并以该模型研究TRC的放疗抵抗机制,发现其可能通过高表达GPX4,低表达ACSL4抵抗铁死亡,从而抵抗放疗的潜在机制。本研究提出的TRC抵抗铁死亡的现象与当前铁死亡研究领域认为的铁死亡或可特异性靶向肿瘤干细胞的观点是冲突的,但也是新颖的,为结直肠癌铁死亡诱导疗法的临床转化有一定的参考价值。同时,本研究仍存在诸多局限性,如对

于 TRC 可能通过铁死亡抵抗放疗的研究较为浅显, 目前发现了 GPX4、ACSL4 等关键的铁死亡调控分子在其中发挥重要作用, 而更深入的机制以及有临床转化价值的新靶点有待未来更为深入的探索。

[参考文献]

- [1] BILLER L H, SCHRAG D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review[J]. *JAMA*, 2021, 325(7): 669-685. DOI: 10.1001/jama.2021.0106.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [3] IZUMI D, ISHIMOTO T, MIYAKE K, *et al.* Colorectal cancer stem cells acquire chemoresistance through the upregulation of F-box/WD repeat-containing protein 7 and the consequent degradation of c-Myc[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(9): 2027-2036. DOI: 10.1002/stem.2668.
- [4] MEDEMA J P. Targeting the colorectal cancer stem cell[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9): 888-890. DOI:10.1056/NEJMcibr1706541.
- [5] SCHWITALLA S, FINGERLE A A, CAMMARERI P, *et al.* Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties[J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 25-38. DOI:10.1016/j.cell.2012.12.012.
- [6] LIU J, TAN Y H, ZHANG H F, *et al.* Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells[J]. *Nat Mater*, 2012, 11(8): 734-741. DOI:10.1038/nmat3361.
- [7] QUINTANA E, SHACKLETON M, SABEL M S, *et al.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells[J]. *Nature*, 2008, 456(7222): 593-598. DOI:10.1038/nature07567.
- [8] WO J Y, ANKER C J, ASHMAN J B, *et al.* Radiation therapy for rectal cancer: executive summary of an ASTRO clinical practice guideline[J]. *Pract Radiat Oncol*, 2021, 11(1): 13-25. DOI:10.1016/j.prro.2020.08.004.
- [9] National Comprehensive Cancer Network. NCCN guidelines for colon cancer 2021[Z/OL]. [2022-03-09]. <https://www.nccn.org/patients/guidelines/content/PDF/colon-patient.pdf>.
- [10] KUIPERS E J, GRADY W M, LIEBERMAN D, *et al.* Colorectal cancer[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15065 [2022-03-09]. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>. DOI:10.1038/nrdp.2015.65.
- [11] DAS P K, ISLAM F, LAM A K. The roles of cancer stem cells and therapy resistance in colorectal carcinoma[J/OL]. *Cells*, 2020, 9(6): 1392[2022-03-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32503256/>. DOI:10.3390/cells9061392.
- [12] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072. DOI:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [13] VISWANATHAN V S, RYAN M J, DHRUV H D, *et al.* Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway[J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 453-457. DOI: 10.1038/nature23007.
- [14] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331. DOI:10.1016/j.cell.2013.12.010.
- [15] LEI G, ZHANG Y L, KOPPULA P, *et al.* The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression[J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 146-162. DOI:10.1038/s41422-019-0263-3.
- [16] KEPP O, KROEMER G. Pro-ferroptotic fatty acid metabolism renders cancer cells immunogenic [J/OL]. *Trends Cancer*, 2022: S2405-8033(22)00089-9[2022-04-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35469799/>. DOI: 10.1016/j.trecan.2022.04.002.
- [17] STOCKWELL B R, ANGELI J P F, BAYIR H, *et al.* Ferroptosis: a regulated cell death Nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
- [18] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98. DOI:10.1038/nchembio.2239.
- [19] LEI G, MAO C, YAN Y L, *et al.* Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(11): 836-857. DOI:10.1007/s13238-021-00841-y.
- [20] CHEN X, LI J B, KANG R, *et al.* Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081. DOI: 10.1080/15548627.2020.1810918.

[收稿日期] 2022-03-09

[修回日期] 2022-04-30

[本文编辑] 黄静怡