

网络出版时间: 2024-12-26 15:46:45 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1134.003>

# 爱拉斯汀对急性髓系白血病细胞铁死亡的影响及其相关作用机制

江贤栋<sup>1,2</sup>, 黄莹莹<sup>1,2</sup>, 洪小颖<sup>1,2</sup>, 林昕迪<sup>3</sup>, 林东红<sup>1,2</sup>, 林梨平<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 福建医科大学医学技术与工程学院 福州 350122; <sup>2</sup> 精准医学临床检验技术福建省高校重点实验室 福州 350122; <sup>3</sup> 福建省妇幼保健院生殖医学中心 福州 350003)

**摘要** 目的 探讨溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (LPCAT3) 在爱拉斯汀 (Erastin) 诱导急性髓系白血病 (AML) 细胞铁死亡中的作用及其相关分子调控机制。方法 四唑盐 (MTS) 法检测不同 AML 细胞对铁死亡经典诱导剂 Erastin 的敏感性, 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测其 LPCAT3 mRNA 的基础表达水平, 分析二者关联性。构建慢病毒介导的 LPCAT3 过表达 AML 细胞株 (OE 组) 及阴性对照株 (NC 组)。在 Erastin 干预后, 采用 MTS、流式细胞术及微量法分别检测细胞活力、脂质活性氧 (ROS) 和丙二醛 (MDA)。qPCR 和 Western blot 检测未折叠蛋白反应 (UPR) 经典通路信号分子 (PERK、ATF4、GRP78 等) 的表达水平。采用 UPR 抑制剂 4-苯基丁酸 (4-PBA) 联合干预后检测上述铁死亡相关指标, 分析调控关系。结果 4 种不同 AML 细胞对铁死亡敏感性不同, 其中 K562 细胞相对不敏感, 4 种 AML 细胞对 Erastin 的 IC<sub>50</sub> 与 LPCAT3 表达水平呈负相关 ( $r = -0.919, P < 0.001$ )。Erastin 干预后, 与 NC 组相比, OE 组 K562 细胞的细胞活力被 Erastin 抑制 ( $P < 0.001$ ), 脂质 ROS 与 MDA 水平增加 ( $P < 0.001$ ); qPCR、Western blot 检测结果显示, 与 NC 组相比, OE 组中 UPR 经典通路分子 PERK、ATF4、GRP78 mRNA 和蛋白表达均升高 ( $P < 0.01$ ); 通过 4-PBA 抑制 UPR 通路后, 与未抑制状态相比, K562 细胞活力下降 ( $P < 0.01$ ), 脂质 ROS 与 MDA 水平升高 ( $P < 0.01$ )。结论 过表达 LPCAT3 可促进 K562 细胞铁死亡, 且其激活的 UPR 经典通路 PERK/ATF 负向调控该过程。

**关键词** 爱拉斯汀; 溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3; 铁死亡; UPR 经典通路; 急性髓系白血病; 4-苯基丁酸; 作用机制

**中图分类号** R 733.71; R 730.54

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2025)01-0015-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.003

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是一种造血干细胞异常增生的血液系统恶性肿瘤, 虽然 AML 患者可通过化疗、造血干细胞移植以及基因靶向治疗等多种方法改善生存率, 但临床常用药物的耐药困境仍日益突显<sup>[1]</sup>。铁死亡是 Dixon et al<sup>[2]</sup>提出的一种以铁依赖性、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 堆积为特征的细胞死亡方式。研究<sup>[3]</sup>表明, 肾癌细胞和白血病细胞比其他肿瘤细胞对铁死亡经典诱导剂爱拉斯汀 (Erastin) 更敏感。因此, 探索如何诱导 AML 细胞铁死亡及其相关分子机制可能是 AML 治疗的突破点之一。脂质过氧化被认为是参与铁死亡发生的关键机制之一, 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 与 ROS 反应

导致的脂质过氧化与细胞铁死亡密切相关<sup>[4]</sup>。文献报道, 溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 与其上游长链酯酰辅酶 A 合成酶 4 (long-chain acyl-coenzyme A synthase 4, ACSL4) 协同增加细胞膜磷脂中花生四烯酸等脂肪酸的含量<sup>[5]</sup>。在被诱导发生铁死亡的人慢性髓系白血病细胞中基因筛查显示 LPCAT3 高表达<sup>[6]</sup>, 可见 LPCAT3 促进 PUFA 氧化进而造成细胞脂质过氧化和 ROS 堆积。而目前关于 LPCAT3 调控铁死亡在 AML 中的研究均尚未见报道。该研究拟探讨 LPCAT3 在 Erastin 诱导 AML 细胞铁死亡中的调控作用及其相关机制, 以期诱导 AML 细胞铁死亡提供新的靶标从而突破治疗困境。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** AML 细胞 (Kasumi-1、HL-60、NB4、K562) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂** RPMI-1640 培养基 (美国 Hy-

2024-10-18 接收

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2021J01815); 国家自然科学基金面上项目 (编号: 82072355)

作者简介: 江贤栋, 男, 博士研究生;

林梨平, 女, 硕士, 副教授, 通信作者, E-mail: shelleywj8860@163.com

clone 公司); 铁死亡诱导剂 Erastin、未折叠蛋白反应 (unfolded protein response ,UPR) 通路抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid ,4-PBA) ( 美国 MedChemExpress 公司); 二甲基亚砷( DMSO) 溶液、丙二醛 ( Malondialdehyde ,MDA) 含量检测试剂盒( 北京索莱宝科技有限公司); 四唑盐 ( tetrazolium salt , MTS) 试剂盒( 美国 Promega 公司); BODIPY 581/591 C11 ( 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); *LPCAT3*、蛋白激酶 R 样内质网激酶( protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase ,*PERK*) 、转录激活因子 4 ( activating transcription factor 4 *ATF4*) 、葡萄糖调节蛋白 78( glucose-regulated protein 78 ,*GRP78*) 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶( glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ,*GAPDH*) 引物( 上海尚亚生物技术有限公司); *LPCAT3* 过表达慢病毒( 上海吉凯基因科技有限公司); *PERK* 抗体( 美国 CST 公司); p-*PERK* 抗体、*ATF4* 抗体( 北京博奥森生物技术有限公司); *GRP78* 抗体( 北京义翘神州科技有限公司); *GAPDH* 抗体( 武汉赛维尔生物科技有限公司)。

**1.1.3 主要仪器** 微孔板分光光度计( 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 ,型号: Multiskan Go); 实时荧光定量 PCR( real time quantitative polymerase chain reaction ,qPCR) 仪( 西安天隆科技有限公司 ,型号: Gentier 96E); 二氧化碳培养箱( 上海力新仪器有限公司 ,型号: HF90); 电泳槽、电泳仪、蛋白凝胶成像系统( 美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪( 美国 BD 公司 ,型号: Accuri C6)。

**1.2 方法**

**1.2.1 细胞培养** AML 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中 ,细胞放置在 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 ,取对数生长期的细胞用于实验。

**1.2.2 MTS 法检测细胞活力** 收集细胞接种于 96 孔板 ,每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个 ,设置 3 个复孔。然后用不同浓度的 Erastin ( 0.5、10、20 和 40 μmol/L) 处理细胞。24 h 后每孔加入 20 μl MTS 溶液 ,孵育 4 h 后 ,用酶联免疫检测仪测 490 nm 处吸光度( absorbance ,*A*) 值 *A*<sub>490 nm</sub>。使用 GraphPad Prism 软件对数据进行非线性回归分析 ,得到 Erastin 作用于细胞的半数抑制浓度( IC<sub>50</sub>) 以及细胞活力 ,细胞活力 = [( *A*<sub>用药组</sub> - *A*<sub>空白组</sub>) / ( *A*<sub>未用药组</sub> - *A*<sub>空白组</sub> ) ] × 100%。

**1.2.3 qPCR** 用 TRIzol 提取各组细胞的总 RNA ,分光光度仪检测其 RNA 浓度和纯度 ,按反转录试剂盒操作流程将其反转录成 cDNA。按照 SYBR Green

qPCR Master Mix 试剂盒说明书配好反应体系 ,反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s ,共计 40 个循环 ,设置 55 ~ 98 °C 为熔解曲线 ,每个样本设置 3 个复孔 ,以 *GAPDH* 为内参 ,用 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。所用 qPCR 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列  
Tab. 1 qPCR primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
<i>LPCAT3</i>	F: GGCTGGATACTATTACACTGCC
	R: GATCTTTCCTCCGTCAAAGTAG
<i>PERK</i>	F: GGAAACGAGAGCCGGATTATT
	R: ACTATGTCCATTATGGCAGCTTC
<i>ATF4</i>	F: CTCCGGGACAGATTGGATGTT
	R: GGCTGCTTATTAGTCTCTCTGGAC
<i>GRP78</i>	F: GAAAGAAGGTTACCCATGCAGT
	R: CAGGCCATAAGCAATAGCAGC
<i>GAPDH</i>	F: TCTCTGCTCCTCTGTTCT
	R: GCCCAATACGACCAAAATCC

**1.2.4 细胞转染** 靶向 *LPCAT3* 的过表达慢病毒由上海吉凯基因公司协助构建 ,取对数生长期的 K562 细胞接种至 96 孔板 ,加入 *LPCAT3* 过表达病毒液感染。经嘌呤霉素筛选后 ,获得稳定过表达 *LPCAT3* 的 K562 细胞系( over expression ,OE 组) ,利用阴性对照慢病毒转染后作为对照组( negative control ,NC 组) 。qPCR 和 Western blot 验证 *LPCAT3* 过表达情况。

**1.2.5 细胞内脂质 ROS 检测** 取 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞于 6 孔板 ,加入 BODIPY 581/591 荧光探针( 1 μmol/L) ,避光孵育 30 min 后移去培养基 ,用 PBS 清洗细胞 2 次 ,再次加入 PBS 使用流式细胞仪在 488 nm 的激发波长下检测 FL1 通道的荧光强度。

**1.2.6 细胞内 MDA 水平检测** 收集 5 × 10<sup>6</sup> 细胞处理后超声破碎 ,按试剂盒说明书进行实验操作 ,将反应体系取 200 μl 至 96 孔板 ,使用多功能酶标仪检测 *A* 值并计算检测细胞中 MDA 含量。

**1.2.7 Western blot 检测** 收集细胞加入 RIPA 裂解液后超声裂解细胞 ,离心后用 BCA 试剂盒进行蛋白定量检测 ,再进行 SDS-PAGE 电泳 ,电泳过后转膜至 PVDF 膜 5% 牛奶封闭 2 h ,一抗 4 °C 过夜孵育 ,次日洗膜后二抗室温孵育 1 h ,将 PVDF 膜放在化学发光成像系统中成像 ,检测目标蛋白条带。

**1.3 统计学处理** 使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行分析和作图 ,所有实验均独立重复 3 次 ,实验数据以均数 ± 标准差(  $\bar{x} \pm s$ ) 表示 ,组间两两比较采用 *t*

检验,多组间比较采用单因素方差分析 相关性分析采用 Pearson 线性相关分析  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AML 细胞对铁死亡的敏感性分析** 以一定浓度梯度(5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ )的铁死亡诱导剂 Erastin 干预四株 AML 细胞,MTS 检测结果显示,Erastin 剂量依赖性地抑制了 HL-60、Kasumi-1、NB4 的细胞活力( $F = 9.133, 4.599, 274.5$ , 均  $P < 0.05$ ),但对 K562 的细胞活力几乎没有影响,仅在较大的浓度(40  $\mu\text{mol/L}$ )下才可显著抑制 K562 的细胞活力( $F = 1.043, P < 0.05$ ),见图 1A。铁死亡指标 MDA 检测结果显示,Erastin 剂量依赖性地增加了 Kasumi-1、HL-60、NB4 细胞中的 MDA 水平,而 Erastin 仅在较大的浓度(40  $\mu\text{mol/L}$ )下才可显著提高 K562 细胞中的 MDA 水平( $F = 8.001, P < 0.05$ ),见图 1B。因此,K562 细胞对铁死亡相对不敏感。

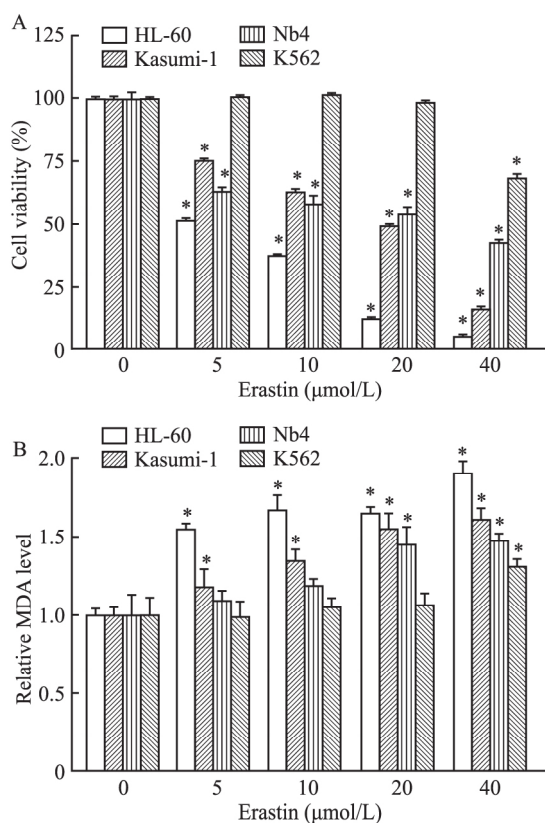


图1 AML 细胞对铁死亡的敏感性分析

Fig.1 Analysis of the sensitivity of AML cells to ferroptosis

A: Cell viability of AML cells after treatment with Erastin; B: Relative MDA levels in AML cells after treatment with Erastin; \*  $P < 0.05$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  Erastin group.

**2.2 AML 细胞对铁死亡的敏感性与 LPCAT3 表达相关性分析** qPCR 检测结果显示 LPCAT3 mRNA 在 K562 细胞中表达最低,见表 2。相关性分析显示 4 种 AML 细胞 Erastin 的  $\text{IC}_{50}$  与 LPCAT3 表达水平呈负相关( $r = -0.919, P < 0.001$ ),见图 2。因此,选择对铁死亡相对不敏感的 K562 细胞作为后续实验细胞株。

表 2 AML 细胞 Erastin 的  $\text{IC}_{50}$  与 LPCAT3 mRNA 的表达水平( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2  $\text{IC}_{50}$  of Erastin and LPCAT3 mRNA expression level in AML cells( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

Cell lines	$\text{IC}_{50}$ of Erastin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Relative LPCAT3 mRNA level
HL-60	5.661 $\pm$ 0.102	1.362 $\pm$ 0.019
Kasumi-1	15.196 $\pm$ 0.370	1.000 $\pm$ 0.081
NB4	22.863 $\pm$ 0.675	0.935 $\pm$ 0.039
K562	46.540 $\pm$ 1.463	0.674 $\pm$ 0.141

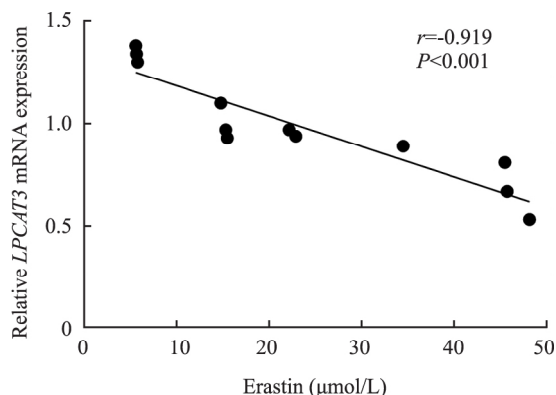


图 2 AML 细胞对铁死亡的敏感性与 LPCAT3 表达相关性分析  
Fig.2 Correlation analysis between the sensitivity of AML cells to ferroptosis and the expression of LPCAT3

## 2.3 LPCAT3 过表达对 AML 细胞铁死亡的影响

将 LPCAT3 过表达载体转染进 K562 细胞后,qPCR 和 Western blot 检测结果均显示,与 NC 组相比,OE 组细胞内 LPCAT3 表达增加( $P < 0.001$ ),见图 3A、B。MTS 结果显示,与 NC 组相比,OE 组细胞中 Erastin 的  $\text{IC}_{50}$  降低( $P < 0.001$ ),见图 3C。选取 20  $\mu\text{mol/L}$  作为后续 Erastin 干预的浓度,流式细胞术直方图中显示,OE 组较 NC 组荧光强度峰出现右移,提示相对于 NC 组,OE 组细胞内脂质 ROS 水平升高,见图 3D。MDA 检测结果显示,OE 组细胞较 NC 组中 MDA 含量增加( $P < 0.001$ ),见图 3E。

## 2.4 LPCAT3 过表达对铁死亡 AML 细胞中 UPR 经典通路的影响

Erastin 干预后,qPCR 和 Western

blot 检测结果均显示,OE 组 K562 细胞中 UPR 经典通路分子 PERK、ATF4 和 GRP78 等分子表达升高 ( $P < 0.01$ )。见图 4。

**2.5 抑制 UPR 经典通路对 AML 细胞铁死亡的影响** 以  $5 \mu\text{mol/L}$  UPR 抑制剂 4-PBA 和 Erastin 联合干预后, K562 细胞中 PERK、ATF4、GRP78 mRNA 和

蛋白表达水平均较 Erastin 处理组降低 ( $P < 0.01$ )，见图 5A、B。MTS 检测结果显示,与 Erastin 组相比, K562 细胞活力在 4-PBA 和 Erastin 联合干预后降低 ( $P < 0.01$ )，见图 5C; 相对于仅用 Erastin 干预, 4-PBA 和 Erastin 联合干预后 K562 细胞中 ROS 水平升高,且 MDA 水平也增加 ( $P < 0.01$ )，见图 5D、E。

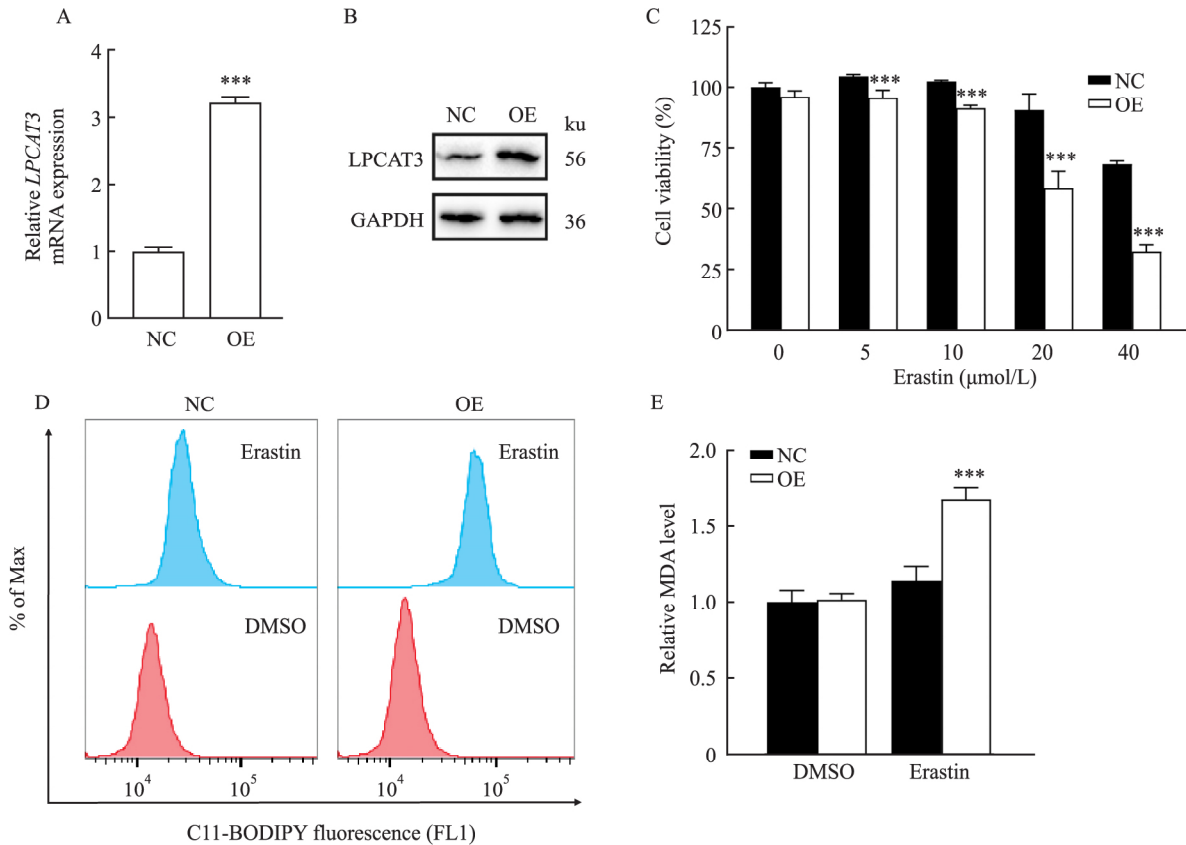


图 3 LPCAT3 过表达对 AML 细胞铁死亡的影响

Fig. 3 Effect of LPCAT3 overexpression on ferroptosis of AML cells

A: Relative mRNA expression level of LPCAT3 in K562 cells; B: Relative protein expression level of LPCAT3 in K562 cells; C: Effect of LPCAT3 overexpression on K562 cell viability; D: Effect of LPCAT3 overexpression on lipid ROS in K562 cells; E: Effect of LPCAT3 overexpression on MDA in K562 cells; \*\*\*  $P < 0.001$  vs NC group.

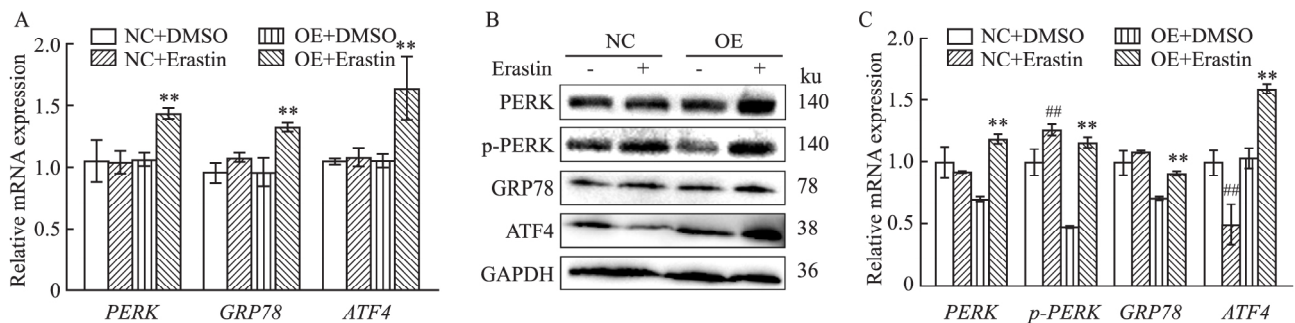


图 4 LPCAT3 过表达对铁死亡 AML 细胞中 UPR 经典通路的影响

Fig. 4 Effect of LPCAT3 overexpression on the classical UPR pathway in ferroptotic AML cells

A: Relative mRNA expression levels of UPR pathway molecules in K562 cells; B: Relative protein expression levels of UPR pathway molecules in K562 cells; C: Quantitative analysis of relative protein levels of UPR pathway molecules in K562 cells; \*\*  $P < 0.01$  vs OE + DMSO group; ##  $P < 0.01$  vs NC + DMSO group.

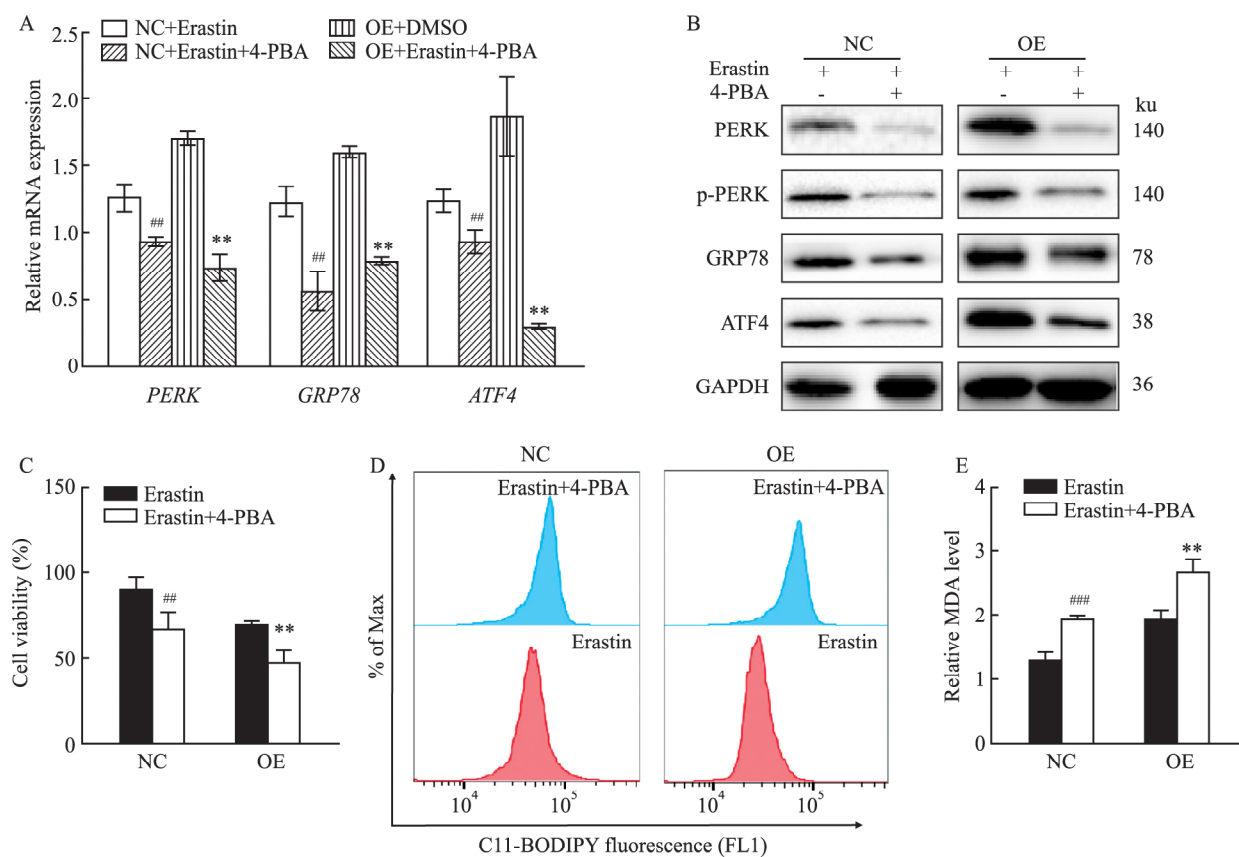


图5 4-PBA对K562细胞铁死亡的影响

Fig. 5 Effect of 4-PBA on ferroptosis of K562 cells

A: Effects of 4-PBA on the mRNA expression levels of UPR pathway-related molecules in K562 cells; B: Effects of 4-PBA on the protein expression levels of UPR pathway-related molecules in K562 cells; C: Effects of 4-PBA on K562 cell viability; D: Effects of 4-PBA on lipid ROS levels in K562 cells; E: Effects of 4-PBA on MDA levels in K562 cells; \*\*  $P < 0.01$  vs OE + Erastin group; ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs NC + Erastin group.

### 3 讨论

高度增殖的肿瘤细胞因其强脂质亲和性导致脂质在细胞内高度积累,进而促进了脂质过氧化过程,产生高水平的ROS,这些ROS最终可能引发肿瘤细胞的氧化损伤乃至自发性死亡<sup>[7]</sup>。在铁死亡的氧化损伤过程中,脂质过氧化及其相伴的氧化应激是关键节点,脂质过氧化通过链式或链式支链反应,放大ROS的作用<sup>[8]</sup>。相关研究<sup>[9]</sup>表明,LPCAT3基因在细胞脂质过氧化中发挥着重要的作用,通过脂质代谢参与细胞ROS形成与积累。LPCAT3介导的脂质重构可调控肠道干细胞的增殖,小鼠肠道中LPCAT3缺失降低了细胞多不饱和脂肪酸的含量,促进肠道肿瘤的发生和发展<sup>[10]</sup>。然而,关于LPCAT3在AML细胞铁死亡中发挥的作用尚不清楚。因此,本研究通过经典铁死亡诱导剂Erastin构建铁死亡AML细胞模型,结果表明,在铁死亡相对不敏感的K562细胞中LPCAT3 mRNA的基础表达水平最低,

初步明确了LPCAT3表达水平与AML细胞对铁死亡敏感性呈正相关。

为深入探讨LPCAT3在AML细胞铁死亡中的调控作用。本研究构建了LPCAT3过表达的慢病毒载体,通过嘌呤霉素筛选获得稳定转染K562细胞株。一定浓度梯度的Erastin干预后,LPCAT3过表达的K562细胞中Erastin的IC<sub>50</sub>明显降低,在20 μmol/L Erastin干预后检测发现细胞内脂质ROS水平和MDA水平在LPCAT3过表达组K562细胞中均明显升高。这表明LPCAT3可增敏AML细胞铁死亡。

据报道<sup>[11]</sup>,LPCAT3缺失的小鼠巨噬细胞中,包含花生四烯酸在内的PUFA含量显著减少。代谢组学研究<sup>[12]</sup>表明,含有花生四烯酸的磷脂酰乙醇胺是发生氧化并使细胞出现铁死亡的关键因素。细胞中过多的PUFA积累会破坏细胞中平衡,增强细胞应激反应。研究<sup>[13]</sup>报道,当细胞受到脂质过氧化性损伤时,会引发细胞内质网应激,激活UPR来防御氧

化性损伤和维持氧化还原平衡。UPR 通路在细胞脂质生物合成<sup>[14]</sup>、氧化还原状态调控等方面发挥重要作用<sup>[15]</sup>。本研究聚焦 UPR 经典分子通路 PERK/ATF4 通过 qPCR 和 Western blot 检测结果显示, Erastin 干预后过表达 *LPCAT3* 的 K562 细胞中 UPR 通路分子 PERK、ATF4 和 GRP78 等表达显著升高, UPR 通路 PERK/ATF4 被激活。为进一步分析 UPR 通路与 *LPCAT3* 的调控关系,本研究选取了一种可通过协助内质网中蛋白质转录后修饰和折叠来减轻 UPR 的药物 4-PBA, 4-PBA 抑制 K562 细胞中的 UPR 通路后, K562 细胞活力较抑制前进一步下降, 脂质 ROS、MDA 水平也随之增加, 可见, 抑制 UPR 通路后, K562 细胞脂质过氧化增强, 细胞铁死亡加剧, 这表明 UPR 经典通路 PERK/ATF 对 K562 细胞铁死亡发挥负向调控作用。

综上所述, 过表达 *LPCAT3* 可促进 K562 细胞铁死亡, 且其激活的 UPR 经典通路 PERK/ATF 负向调控该过程, 该研究有望为探究 AML 耐药提供新的思路和靶标。该研究仅在体外细胞层面进行探讨, 后续将进一步研究 *LPCAT3* 及其 UPR 负调控通路参与体内 AML 细胞铁死亡的作用。

### 参考文献

- [1] 赵雨辰, 杨明珍. 高三尖杉酯碱对急性单核细胞白血病 SHI-1 细胞株诱导凋亡机制的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(8): 1080-4. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.08.012.
- [1] Zhao Y C, Yang M Z. Inducing-apoptosis effect of homoharringtonine on acute monocytic leukemia cell line SHI-1 and its relevant mechanism[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2014, 49(8): 1080-4. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2014.08.012.
- [2] 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): 1060-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [3] Pu F, Chen F, Zhang Z, et al. Ferroptosis as a novel form of regulated cell death: implications in the pathogenesis, oncometabolism and treatment of human cancer[J]. *Genes Dis*, 2022, 9(2): 347-57. doi: 10.1016/j.gendis.2020.11.019.
- [4] 许璐, 汤其强. 丹参酮 II A 抑制 HT22 海马神经发生铁死亡的机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 833-9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.001.
- [4] Xu L, Tang Q Q. Research on the mechanism of tanshinone II A inhibiting ferroptosis in HT22 hippocampus cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2019, 54(6): 833-9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.001.
- [5] Eto M, Shindou H, Koeberle A, et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 is the key enzyme for incorporating arachidonic acid into glycerophospholipids during adipocyte differentiation[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 16267-80. doi: 10.3390/ijms131216267.
- [6] Dixon S J, Winter G E, Musavi L S, et al. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(7): 1604-9. doi: 10.1021/acschembio.5b00245.
- [7] Chuang T C, Shao W S, Hsu S C, et al. Baicalein induces G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest associated with ROS generation and CHK2 activation in highly invasive human ovarian cancer cells[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1039. doi: 10.3390/molecules28031039.
- [8] Fujii J, Yamada K I. Defense systems to avoid ferroptosis caused by lipid peroxidation-mediated membrane damage[J]. *Free Radic Res*, 2023, 57(5): 353-72. doi: 10.1080/10715762.2023.2244155.
- [9] Cui J, Wang Y, Tian X, et al. *LPCAT3* is transcriptionally regulated by YAP/ZEB/EP300 and collaborates with ACSL4 and YAP to determine ferroptosis sensitivity[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2023, 39(7-9): 491-511. doi: 10.1089/ars.2023.0237.
- [10] Wang B, Rong X, Palladino E N D, et al. Phospholipid remodeling and cholesterol availability regulate intestinal stemness and tumorigenesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 206-20. e4. doi: 10.1016/j.stem.2017.12.017.
- [11] Thomas C, Jalil A, Magnani C, et al. *LPCAT3* deficiency in hematopoietic cells alters cholesterol and phospholipid homeostasis and promotes atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2018, 275: 409-18. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.023.
- [12] Ichu T A, Reed A, Ogasawara D, et al. ABHD12 and *LPCAT3* interplay regulates a lyso-phosphatidylserine-C20: 4 phosphatidylserine lipid network implicated in neurological disease[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(19): 1793-9. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00292.
- [13] Iuchi K, Takai T, Hisatomi H. Cell death via lipid peroxidation and protein aggregation diseases[J]. *Biology*, 2021, 10(5): 399. doi: 10.3390/biology10050399.
- [14] Huang Y, Zhao C, Kong Y, et al. Elucidation of the mechanism of NEFA-induced PERK-eIF2 $\alpha$  signaling pathway regulation of lipid metabolism in bovine hepatocytes[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021, 211: 105893. doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105893.
- [15] Delaney P, Ramdas Nair A, Palmer C, et al. Arsenic induced redox imbalance triggers the unfolded protein response in the liver of zebrafish[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 409: 115307. doi: 10.1016/j.taap.2020.115307.

## Effect and mechanism of Erastin on ferroptosis of acute myeloid leukemia cells

Jiang Xiandong<sup>1,2</sup>, Huang Yingying<sup>1,2</sup>, Hong Xiaoying<sup>1,2</sup>, Lin Xindi<sup>3</sup>, Lin Donghong<sup>1,2</sup>, Lin Liping<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>School of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350122; <sup>2</sup>Key Laboratory of Clinical Laboratory Technology for Precision Medicine, Fujian Province University, Fuzhou 350122;

<sup>3</sup>Reproductive Medicine Center of Fujian Maternal and Child Health Hospital, Fuzhou 350003)

**Abstract Objective** To explore the role of lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3) in Erastin-induced ferroptosis of acute myeloid leukemia (AML) cells and its related molecular regulatory mechanisms. **Methods** Tetrazolium salt (MTS) method was used to detect the sensitivity of different AML cells to the classic ferroptosis inducer Erastin, real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the basal expression level of *LPCAT3* mRNA, and the correlation between them was analyzed. Lentivirus-mediated *LPCAT3* overexpression AML cell lines (OE group) and negative control lines (NC group) were constructed. After Erastin intervention, MTS, flow cytometry, and micromethods were used to detect cell viability, lipid reactive oxygen species (ROS), and Malondialdehyde (MDA), respectively. qPCR and Western blot were used to detect unfolded protein response (UPR) classic pathway signaling molecules (PERK, ATF4, GRP78, etc.) expression levels. The above ferroptosis-related indicators were detected after combined intervention with the UPR inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA), and the regulatory relationship was analyzed. **Results** Four different types of AML cells had different sensitivities to ferroptosis, among which K562 cells were relatively insensitive. The  $IC_{50}$  of the four types of AML cells to Erastin was negatively correlated with the expression level of *LPCAT3* ( $r = -0.919, P < 0.001$ ). After Erastin intervention, the cell viability of K562 cells in the OE group was significantly inhibited by Erastin compared with the NC group ( $P < 0.001$ ), and the levels of lipid ROS and MDA increased ( $P < 0.001$ ). The results of qPCR and Western blot showed that, compared with the NC group, the mRNA and protein expression of UPR classic pathway molecules *PERK*, *ATF4*, and *GRP78* mRNA and protein increased in the OE group ( $P < 0.01$ ). After inhibiting the UPR pathway by 4-PBA, the viability of K562 cells decreased ( $P < 0.01$ ), and lipid ROS and MDA levels increased ( $P < 0.01$ ) compared with the uninhibited state. **Conclusion** Overexpression of *LPCAT3* can promote ferroptosis in K562 cells, and this process is negatively regulated by the classical UPR pathway PERK/ATF.

**Key words** Erastin; LPCAT3; ferroptosis; UPR classic pathway; acute myeloid leukemia; 4-phenylbutyric acid; mechanism of action

**Fund programs** Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2021J01815); National Natural Science Foundation of China (No. 82072355)

**Corresponding author** Lin Liping, E-mail: shelleywj8860@163.com