

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.003

· 基础研究 ·

ACTL6A 通过调控 GPX4 介导的铁死亡促进弥漫大 B 细胞淋巴瘤细胞多柔比星耐药

王铃¹, 任映敏², 胡彩华¹, 缪宗³(1. 东南大学附属南通市第一人民医院 血液内科, 江苏 南通 226000; 2. 复旦大学附属华山医院 血液内科, 上海 200040; 3. 海军军医大学第一附属医院 脑外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探究肌动蛋白样蛋白 6A (ACTL6A) 通过调控铁死亡参与弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 细胞多柔比星 (DOX) 耐药的机制。**方法:**培养亲本 DLBCL 细胞 SU-DHL-4 与耐药细胞 SU-DHL-4/DOX, qPCR 和 WB 法检测 ACTL6A 表达变化; 通过转染携带靶向 ACTL6A 干扰序列 (sh-ACTL6A) 及其阴性对照 (sh-NC) 的质粒, 构建敲减 ACTL6A 的 SU-DHL-4/DOX, qPCR 和 WB 法检测转染后细胞中 ACTL6A、铁死亡相关蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、长链酰基辅酶 A 合成酶 4 (ACSL4) 的表达水平, 染色质免疫沉淀 (ChIP)、双萤光素酶报告基因实验验证 ACTL6A 与 GPX4 间的靶向结合与调控作用。将 SU-DHL-4/DOX 细胞分为对照组、sh-NC 组、sh-ACTL6A 组、sh-NC + oe-GPX4 组和 sh-ACTL6A + oe-GPX4 组, 用转染试剂将相应质粒转染至细胞中, qPCR 和 WB 法检测各组细胞中 ACTL6A 和 GPX4 表达水平, CCK-8 法检测不同浓度 DOX 处理后各组细胞存活率, FerroOrange 探针检测各组细胞中亚铁离子 (Fe²⁺) 水平, Liperfluo 探针检测各组细胞中脂质过氧化物水平, DCFH-DA 探针检测各组细胞中活性氧 (ROS) 水平, 比色法检测各组细胞中谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 含量。**结果:**与 SU-DHL-4 细胞相比, SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A mRNA 和蛋白均呈高表达 (均 $P < 0.05$); ACTL6A 与 GPX4 间存在靶向结合关系; 敲减 ACTL6A 后 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 和 GPX4 mRNA 及其蛋白表达水平均明显下降 (均 $P < 0.05$), 表明 ACTL6A 可调控 GPX4 的表达; 敲减 ACTL6A 可抑制 SU-DHL-4/DOX 细胞的存活率, 促进细胞内 Fe²⁺、脂质过氧化物、ROS、MDA 的生成, 抑制 GSH 生成 (均 $P < 0.05$); 而在敲减 ACTL6A 的同时过表达 GPX4 可上调 SU-DHL-4/DOX 细胞中 GPX4 的 mRNA 及其蛋白表达水平 (均 $P < 0.05$), 并提高细胞存活率, 抑制细胞内 Fe²⁺、脂质过氧化物、ROS、MDA 的生成, 并增加 GSH 生成 (均 $P < 0.05$)。**结论:**ACTL6A 在 DOX 耐药 DLBCL 细胞中高表达, 通过调控 GPX4 表达抑制铁死亡, 促进 DLBCL 细胞耐药。

[关键词] 肌动蛋白样蛋白 6A; 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; 多柔比星; 铁死亡; 谷胱甘肽过氧化物酶 4

[中图分类号] R733.7; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2026) 03-0243-09

Study on the role of ACTL6A in promoting doxorubicin resistance in diffuse large B cell lymphoma cells by regulating GPX4-mediated ferroptosis

WANG Ling¹, REN Yimin², HU Caihua¹, MIAO Zong³(1. Department of Hematology, Nantong First People's Hospital Affiliated to Southeast University, Nantong 226000, Jiangsu, China; 2. Department of Hematology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China; 3. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of the Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism by which actin-like protein 6A (ACTL6A) regulates ferroptosis and contributes to doxorubicin (DOX) resistance in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cells. **Methods:** The parental DLBCL cell line SU-DHL-4 cells and its DOX-resistant variant SU-DHL-4/DOX cells were cultured. Changes in the expression of ACTL6A were detected by qPCR and WB assay. SU-DHL-4/DOX cells with ACTL6A knockdown were constructed by transfecting plasmids carrying a short hairpin RNA targeting ACTL6A (sh-ACTL6A) or its negative control (sh-NC). The expression levels of ACTL6A and ferroptosis-related proteins, including glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), were measured using qPCR and WB. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and dual-luciferase reporter assays were performed to verify the targeting and regulatory relationship between ACTL6A and GPX4. SU-DHL-4/DOX cells were divided into Control, sh-NC, sh-ACTL6A, sh-NC + oe-GPX4, and sh-ACTL6A + oe-GPX4 groups. Corresponding plasmids were transfected into the cells. CCK-8 assay was used to detect cell survival rates of each group under different concentrations of DOX

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(82303915); 中国青年创业就业基金; 南通大学临床医学专项科研基金(2023JY001)

[作者简介] 王铃, 博士, 主治医师

[通信作者] 缪宗(扫码获取作者通信方式)



treatment. FerroOrange, Liperfluo, and DCFH-DA probes were used to detect ferrous ion (Fe^{2+}) levels, lipid peroxidation, and reactive oxygen species (ROS) in each group of cells, respectively. A colorimetric method was used to measure the contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in each group of cells. **Results:** Both ACTL6A mRNA and protein were highly expressed in SU-DHL-4/DOX cells (both $P < 0.05$), compared to SU-DHL-4 cells. ACTL6A and GPX4 have a targeting binding relationship. Knockdown of ACTL6A significantly decreased the mRNA and protein expression of ACTL6A and GPX4 in SU-DHL-4/DOX cells (both $P < 0.05$), indicating that ACTL6A regulates GPX4 expression. Knockdown of ACTL6A significantly inhibited the survival of SU-DHL-4/DOX cells, increased intracellular Fe^{2+} , lipid peroxides, ROS, and MDA levels, and inhibited GSH production (all $P < 0.05$). However, overexpression of GPX4 in ACTL6A-knockdown cells upregulated the mRNA and protein expression levels of GPX4 in SU-DHL-4/DOX cells (both $P < 0.05$), increased cell survival rate, inhibited the production of intracellular Fe^{2+} , lipid peroxides, ROS, and MDA, and increased GSH production (all $P < 0.05$). **Conclusion:** ACTL6A is highly expressed in DOX-resistant DLBCL cells. By regulating GPX4 expression, ACTL6A inhibits ferroptosis and promotes drug resistance in DLBCL cells.

[Key words] actin-like protein 6A (ACTL6A); diffuse large B cell lymphoma (DLBCL); doxorubicin (DOX); ferroptosis; glutathione peroxidase 4 (GPX4)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(3): 243-251. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2026.03.003]

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 是成人最常见的淋巴造血系统恶性肿瘤, 约占所有非霍奇金淋巴瘤的 30%, 具有高度侵袭性^[1]。近年来, DLBCL 的诊断与治疗手段不断进步, 以利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星 (doxorubicin, DOX)、长春新碱和泼尼松龙 (R-CHOP) 的免疫化疗仍为一线治疗方案^[2]。然而, 约有三分之一的患者通过一线标准治疗后可能出现化疗耐药, 甚至发展为难治或复发性疾病, 临床预后不佳^[3]。因此, 深入了解耐药性产生的分子机制对于优化 DLBCL 的治疗策略具有重要意义。铁死亡是一种新发现的铁依赖性, 非凋亡性细胞死亡方式, 以细胞内铁离子积累、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和脂质过氧化物水平升高为主要特征; 参与神经退行性疾病、心血管疾病、肿瘤等多种疾病的发病机制^[4-5]。谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 是铁死亡的重要负调控因子, 通过降低谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的转化来减少脂质过氧化, 维持细胞内氧化还原平衡, 从而抑制铁死亡。研究^[6-7]发现, GPX4 的表达上调与肿瘤发生和转移密切相关, 其可通过抑制铁死亡促进多种肿瘤细胞的化疗耐药性产生。然而, GPX4 如何通过调节铁死亡影响 DLBCL 的耐药, 其具体机制尚不明确。肌动蛋白样蛋白 6A (actin-like protein 6A, ACTL6A) 属于交配型转换/蔗糖不发酵 (switch/sucrose non-fermentable, SWI/SNF) 染色质重塑复合物成员之一, 在染色质结构调控、基因转录调控及细胞干性维持等过程中发挥重要作用。目前, 在宫颈癌^[8]、口腔鳞状细胞癌^[9]、乳腺癌^[10]等多种实体瘤中检测到 ACTL6A 呈高表达, 并与肿瘤细胞的增殖、迁移、耐药等密切相关。研究^[11]表明, ACTL6A 可通过促进 GSH 合成, 从而抑制胃癌细胞发生铁死亡。然而, ACTL6A 在 DLBCL 中是否通过调控铁死亡介导化疗耐药尚不明确。本研

究以 DOX 耐药 DLBCL 细胞 SU-DHL-4/DOX 为研究对象, 检测 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 的表达变化, 并通过敲低 ACTL6A 表达进一步探讨其对细胞铁死亡及 DOX 耐药性的影响, 以期揭示 DLBCL 耐药机制并寻找潜在的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂和仪器

亲本 DLBCL 细胞 SU-DHL-4、耐药细胞 SU-DHL-4/DOX 均购自中国科学院上海细胞库, RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、TRIzol 试剂、Lipofectamine™ 3000 转染试剂均购自美国 Invitrogen 公司, Hifair II 第一链 cDNA 合成试剂盒和 Hifair III One Step RT-qPCR SYBR Green 试剂盒均购自上海翌圣生物科技有限公司, SimpleChIP® Plus 酶解染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自武汉亚科因生物技术公司, CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司, FerroOrange 探针和 Liperfluo 探针购自上海觅拓生物科技有限公司, DCFH-DA 探针和 RIPA 裂解液购自上海碧云天生物公司, GSH 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司, DOX 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司, ACTL6A、GPX4、GAPDH 一抗和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG 二抗均购自美国 CST 公司, sh-ACTL6A 干扰质粒、sh-NC 阴性对照质粒及 GPX4 过表达质粒均由上海吉玛生物科技有限公司构建。ABI QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, DYY-6C 型电泳仪购自北京六一仪器厂, Olympus IX 73 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,

FACSCanto II 流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司, MF9602 微孔板酶标仪购自上海仪电物理光学仪器有限公司生产。

1.2 细胞培养、转染与分组

将亲本 SU-DHL-4 细胞与耐药 SU-DHL-4/DOX 细胞复苏, 添加含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中, 进行常规传代培养。

将 SU-DHL-4/DOX 细胞分为对照组(正常培养)、sh-NC 组(转染 sh-NC)、sh-ACTL6A 组(转染 sh-ACTL6A)、sh-NC + oe-GPX4 组(转染 sh-NC 和 GPX4 过表达质粒)和 sh-ACTL6A + oe-GPX4 组(转染 sh-ACTL6A 和 GPX4 过表达质粒)。用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂将 sh-NC、sh-ACTL6A 质粒和 GPX4 过表达质粒转染至相应组别的细胞中, 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3 qPCR 法检测各组细胞中 ACTL6A、GPX4、SLC7A11 和 ACSL4 mRNA 的表达

用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度。取 1 μg 总 RNA, 用 Hifair II 第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录反应合成 cDNA。在 ABI QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪上进行 qPCR 反应, 按照 Hifair III One Step RT-qPCR SYBR Green 试剂盒说明书配置反应体系, PCR 反应程序为 95 °C 30s, 95 °C 5s, 60 °C 30s, 共 40 个循环。引物序列: ACTL6A 上游引物为 5'-TGGAGGCCA TTTACCTCTAA-3', 下游引物为 5'-TCTTTGCTC TAGTATTCCACGGT-3'; GPX4 上游引物为 5'-CCG CCTTGCCGCCTAC-3', 下游引物为 5'-TTCTTCAT CTCTTGCCGCCT-3'; SLC7A11 上游引物为 5'-GGC TGTCATTGGTGACTTTG-3', 下游引物为 5'-GTT GTCAGGAGGGCAGTGAA-3'; ACSL4 上游引物为 5'-GAAGATGCTGGGCGTGAAG-3', 下游引物为 5'-CATGGTCAGGAGACAGAGGA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游引物为 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。

1.4 WB 法检测各组细胞中 ACTL6A、GPX4、SLC7A11 和 ACSL4 蛋白的表达

收集各组细胞, 用含磷酸盐和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白加热变性后, 用 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉溶液室温下封闭 1 h, 分别滴加 ACTL6A(1:1 000)、GPX4(1:1 000)、SLC7A11(1:1 000)、ACSL4(1:1 000)及

GAPDH(1:5 000)一抗, 于 4 °C 下处理过夜, 次日, 用 TBST 洗膜后, 加入对应 HRP 标记二抗(1:5 000), 室温下处理 1 h, 再次洗膜后, ECL 显影、拍照, 用 ImageJ 软件分析目的蛋白的灰度值。

1.5 ChIP 实验检测 SU-DHL-4 细胞中 ACTL6A 和 GPX4 的关系

用 1% 甲醛交联细胞, 室温固定 15 min, 加入甘氨酸终止反应, 细胞裂解后通过超声破碎染色质, 获得 200~1 000 bp 片段。将等量染色质与 ACTL6A 抗体、IgG 对照抗体在 4 °C 下处理过夜, 加入 protein A 琼脂糖珠, 4 °C 处理 2 h, 洗涤免疫复合物, 加入 Chelex 100 树脂于 100 °C 下加热 10 min 以逆交联, 蛋白酶 K 处理 30 min, 回收纯化 DNA, 进行 PCR 扩增检测 GPX4 表达。

1.6 双萤光素酶报告基因实验检测 ACTL6A 对 GPX4 转录活性的影响

将 GPX4 野生型(WT)和突变型(MUT)片段克隆到 pHY-811 双萤光素酶报告载体中。SU-DHL-4/DOX 细胞接种于 24 孔板中, 细胞汇合度达到 60%~70% 时, 用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂将 sh-NC 与 sh-ACTL6A 质粒分别与 GPX4 WT、GPX4 MUT 质粒共转染细胞, 48 h 后收集细胞, 使用萤光素酶报告基因检测试剂盒进行萤光素酶活性检测。

1.7 CCK-8 法检测不同质量浓度的 DOX 对 SU-DHL-4/DOX 细胞存活率的影响

将各组 SU-DHL-4/DOX 细胞以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 贴壁后分别给予 0、16、32、64、128 mg/L DOX 处理 48 h, 每组设 3 个复孔, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续培养 2 h, 于 450 nm 波长处检测各孔光密度(D)值, 以“(D_{实验}-D_{空白})/(D_{对照}-D_{空白})×100%”计算各组细胞的存活率。

1.8 FerroOrange 探针检测细胞中 Fe²⁺ 水平

收集按 1.2 节中方法处理后的 SU-DHL-4/DOX 细胞, PBS 洗涤, 更换为含 1 μmol/L FerroOrange 荧光探针的无血清培养基, 37 °C 处理 30 min, 避光条件下完成染色后, 再次用 PBS 洗涤, 用荧光显微镜观察并拍照, ImageJ 软件分析红色荧光强度变化以评估 Fe²⁺ 水平。

1.9 Liperfluo 探针检测细胞中脂质过氧化物水平

按 1.2 节中方法分组处理 SU-DHL-4/DOX 细胞后, 加入终浓度为 5 μmol/L 的 Liperfluo 荧光探针, 在 37 °C 下避光处理 30 min, PBS 洗涤, 用荧光显微镜观察并拍照, 脂质过氧化物呈绿色荧光, ImageJ 软件分析荧光强度变化以反映细胞中脂质过氧化水平。

1.10 流式细胞术检测 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ROS

水平,比色法检测 SU-DHL-4/DOX 细胞中 GSH 和 MDA 含量

按 1.2 节中方法分组处理 SU-DHL-4/DOX 细胞后,用 ROS 检测探针 DCFH-DA (10 μmol/L) 标记细胞,37 °C 避光处理 30 min, PBS 洗涤,用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。将细胞裂解后,收集裂解液用于 GSH 和 MDA 含量测定,分别按照 GSH 和 MDA 检测试剂盒说明书操作,通过比色法测定各孔 D 值,计算 GSH 和 MDA 含量。

1.11 统计学处理

所有实验均独立重复 3 次。用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计学分析,绘图使用 GraphPad Prism 9.0 软件完成。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),事后两两比较使用 LSD-*t* 检

验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

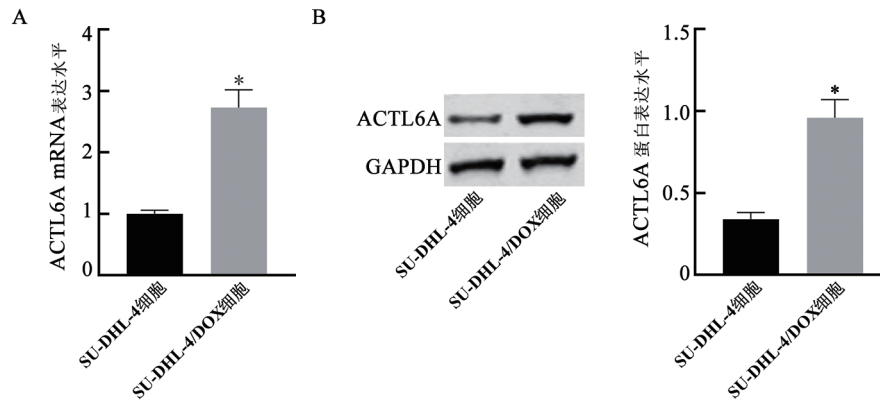
2 结果

2.1 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 呈高表达

qPCR 和 WB 法检测结果(图 1)显示,与 SU-DHL-4 细胞比较, SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A mRNA 和蛋白的表达水平均明显升高 (均 $P < 0.05$)。

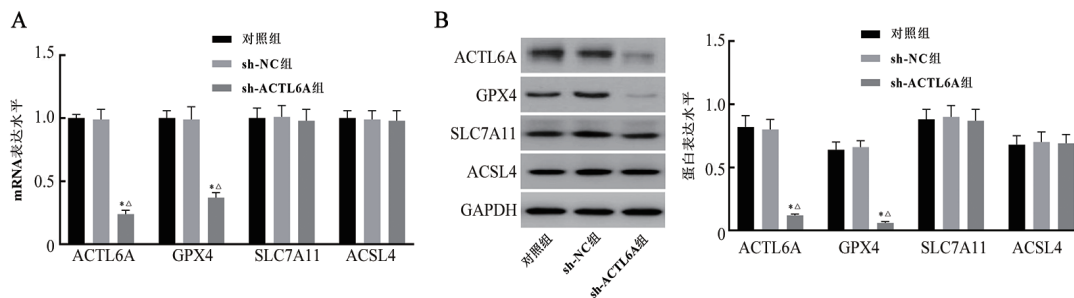
2.2 转染后 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 及 GPX4、SLC7A11、ACSL4 表达比较

qPCR 和 WB 法检测结果(图 2)显示,与对照组或 sh-NC 组比较, sh-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A、GPX4 mRNA 和其蛋白表达水平均显著下降 (均 $P < 0.05$); SLC7A11、ACSL4 mRNA 和其蛋白表达水平无明显变化。



A: qPCR 法检测细胞中 ACTL6A mRNA 表达; B: WB 法检测细胞中 ACTL6A 的蛋白表达。与 SU-DHL-4 细胞比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 SU-DHL-4 细胞与 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 的 mRNA 与蛋白表达



A: qPCR 法检测细胞中 ACTL6A 及 GPX4、SLC7A11、ACSL4 mRNA 的表达; B: WB 法检测细胞中 ACTL6A 及 GPX4、SLC7A11、ACSL4 蛋白的表达。与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 转染后 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 及 GPX4、SLC7A11、ACSL4 的 mRNA 与蛋白表达

2.3 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 与 GPX4 间存在靶向结合关系

CHIP 实验检测结果(图 3A)显示,与 IgG 组比较, Anti-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中 GPX4 基因启动子区域的 DNA 富集量增加,说明 ACTL6A 能够特异性结合 GPX4。双萤光素酶报告基因实验

检测结果(图 3B)显示,与 sh-NC + GPX4 WT 组比较, sh-ACTL6A + GPX4 WT 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中萤光素酶活性显著下降 ($P < 0.05$), sh-NC + GPX4 MUT 组与 sh-ACTL6A + GPX4 MUT 组间萤光素酶活性无明显差异。实验结果说明, ACTL6A 可靶向结合 GPX4。

2.4 SU-DHL-4/DOX 细胞中敲减 ACTL6A 可明显降低 GPX4 的表达

qPCR 和 WB 法检测结果(图4)显示,与对照组、sh-NC 组比较,sh-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 和 GPX4 的 mRNA 及其蛋白表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$);与 sh-ACTL6A 组比较,sh-ACTL6A + oe-GPX4 组中 GPX4 mRNA 及其蛋白表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,在 sh-ACTL6A 组细胞中成功地敲减了 ACTL6A,与 sh-ACTL6A 组细胞相比,sh-ACTL6A + oe-GPX4 组细胞过表达了 GPX4,敲减 ACTL6A 可明显降低 GPX4 的表达。

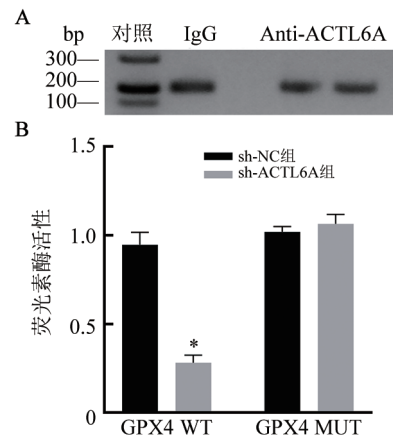
2.5 敲减 ACTL6A 可明显降低 SU-DHL-4/DOX 细胞的存活率

CCK-8 法检测结果(图5)显示,在同一浓度的 DOX 处理下,与对照组、sh-NC 组比较,sh-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞存活率显著下降($P < 0.05$),与 sh-ACTL6A 组比较,sh-ACTL6A + oe-GPX4 组细胞存活率显著升高($P < 0.05$);实验结果说明,敲减 ACTL6A 可明显降低 SU-DHL-4/DOX 细胞的存活率,过表达 GPX4 可促进其存活。

2.6 敲减 ACTL6A 促进 SU-DHL-4/DOX 细胞中 Fe^{2+}

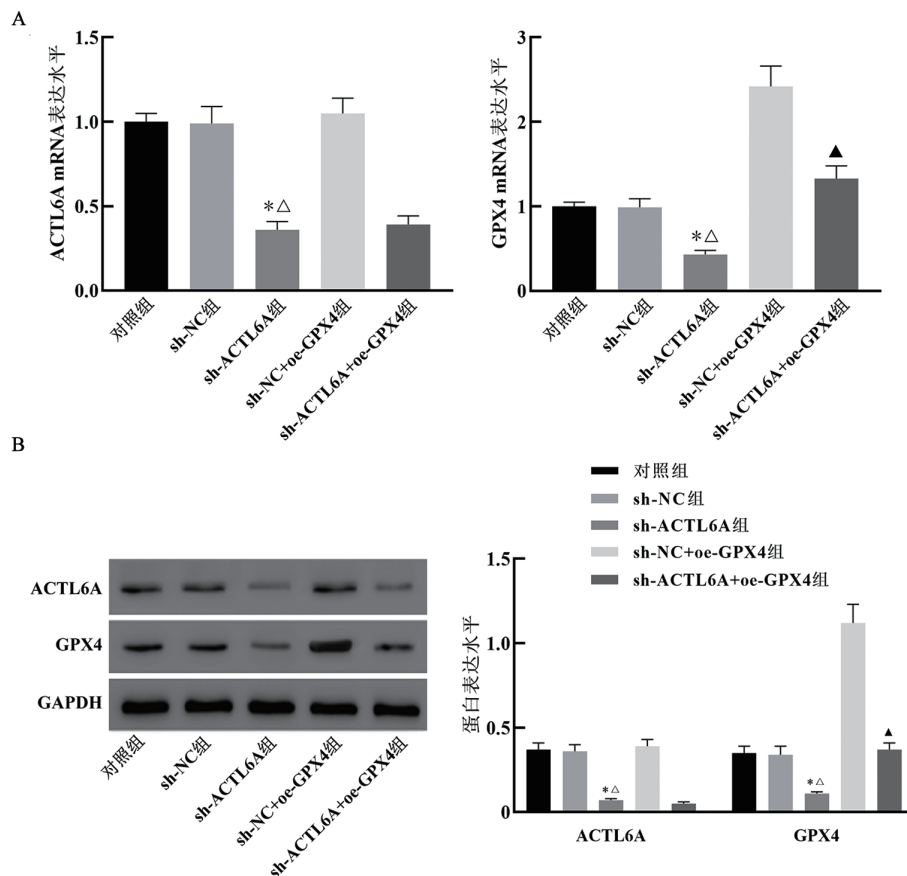
生成,而过表达 GPX4 则抑制其生成

FerroOrange 探针检测结果(图6)显示,与对照组、sh-NC 组比较,sh-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中荧光强度显著增加($P < 0.05$);与 sh-ACTL6A 组比较,sh-ACTL6A + oe-GPX4 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中荧光强度明显减弱($P < 0.05$),说明过表达 GPX4 抑制 SU-DHL-4/DOX 细胞中 Fe^{2+} 的生成。



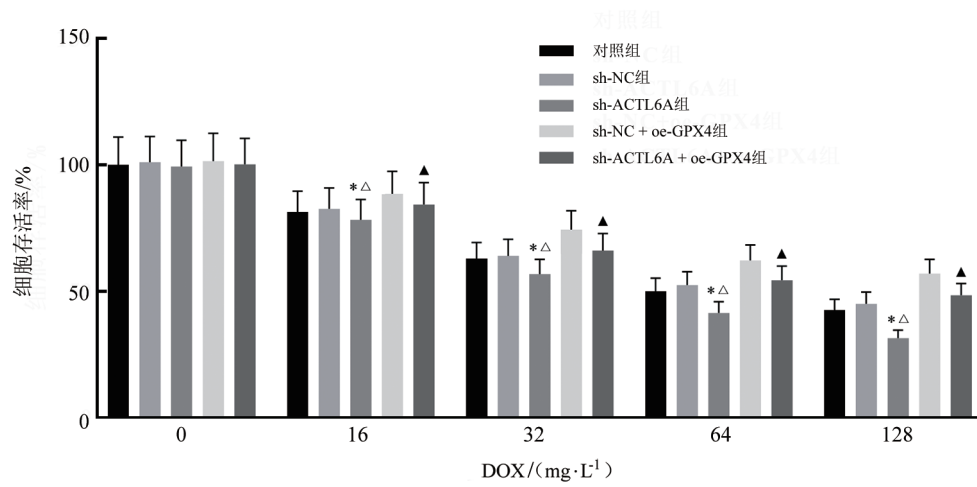
A: ChIP 实验检测细胞中 ACTL6A 与 GPX4 启动子的结合; B: 双萤光素酶报告基因实验检测细胞中相对萤光素酶活性。与 sh-NC + GPX4 WT 组比较, * $P < 0.05$ 。

图3 ACTL6A 调控 GPX4 表达



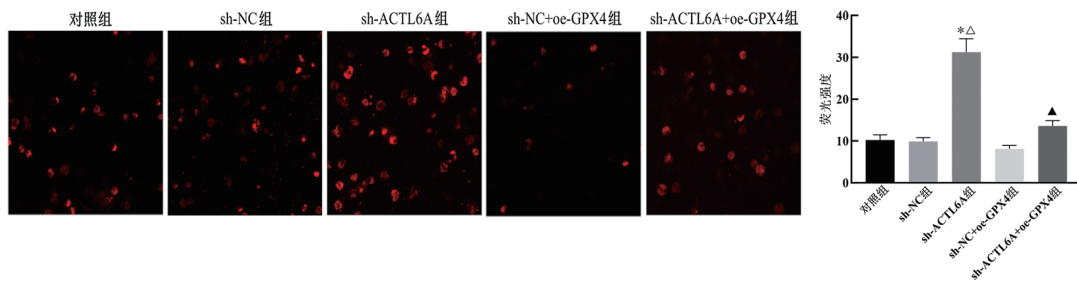
A: qPCR 法检测细胞中 ACTL6A 和 GPX4 mRNA 表达; B: WB 法检测细胞中 ACTL6A 和 GPX4 蛋白表达。与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 sh-ACTL6A 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图4 各组 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ACTL6A 和 GPX4 表达



与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 sh-ACTL6A 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图5 各组SU-DHL-4/DOX细胞存活率



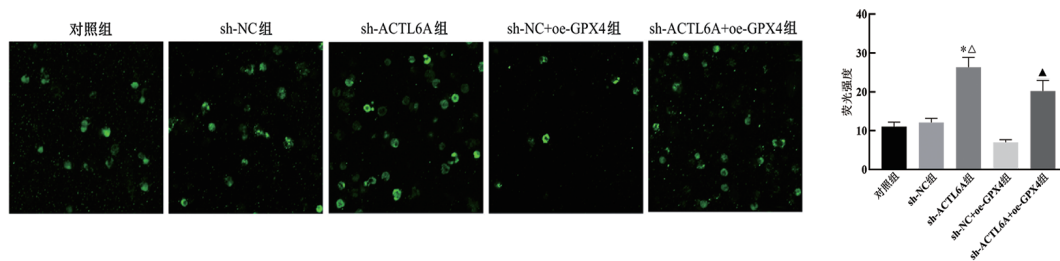
与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 sh-ACTL6A 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图6 各组SU-DHL-4/DOX细胞内Fe²⁺水平(FerroOrange探针, ×200)

2.7 敲减 ACTL6A 可升高 SU-DHL-4/DOX 细胞中脂质过氧化物、ROS 和 MDA 的水平, 降低 GSH 水平, 而过表达 GPX4 可逆转以上变化

Liperfluo 探针检测结果(图7)显示, 与对照组、sh-NC 组比较, sh-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中荧光强度显著增加($P < 0.05$), 表明脂质过氧化物含

量升高; 与 sh-ACTL6A 组比较, sh-ACTL6A + oe-GPX4 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中荧光强度显著减弱($P < 0.05$), 表明脂质过氧化物含量低于 sh-ACTL6A 组。实验结果说明, 敲减 ACTL6A 可导致 SU-DHL-4/DOX 细胞脂质过氧化水平升高, 而过表达 GPX4 可逆转这一效应。

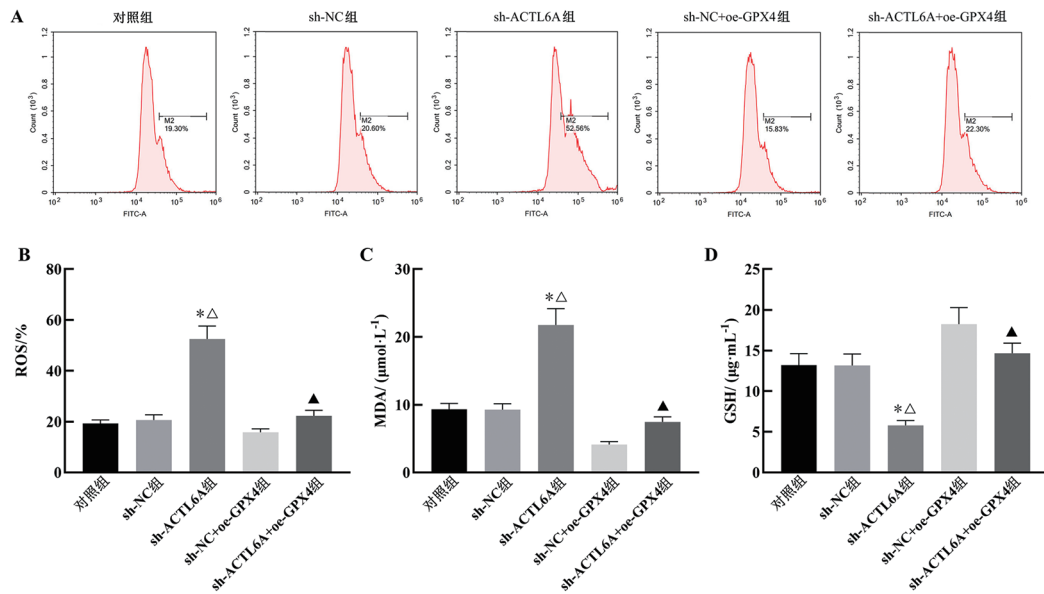


与对照组比较, * $P < 0.05$, 与 sh-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 sh-ACTL6A 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图7 各组SU-DHL-4/DOX细胞脂质过氧化物含量(Liperfluo 探针, ×200)

此外, 流式细胞术、比色法检测结果(图8)显示, 与对照组、sh-NC 组比较, sh-ACTL6A 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ROS 水平和 MDA 含量显著升高, GSH 含量显著降低(均 $P < 0.05$); 与 sh-ACTL6A 组比较, sh-ACTL6A+oe-GPX4 组 SU-DHL-4/DOX 细胞中

ROS 水平和 MDA 含量显著降低, GSH 含量显著升高(均 $P < 0.05$)。实验结果说明, 敲减 ACTL6A 可升高 SU-DHL-4/DOX 细胞中 ROS 水平和 MDA 含量, 降低 GSH 含量, 而过表达 GPX4 可逆转上述作用。



A: 流式细胞术检测细胞中ROS水平; B: 各组细胞中ROS水平; C: 比色法检测细胞中MDA含量; D: 比色法检测细胞中GSH含量。与对照组比较, * $P < 0.05$, 与sh-NC组比较, $\Delta P < 0.05$; 与sh-ACTL6A组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

图8 各组SU-DHL-4/DOX细胞中ROS、MDA、GSH水平

3 讨论

DOX是DLBCL一线免疫化疗方案中广泛使用的药物之一,但其耐药的发生是导致治疗失败的主要原因^[12]。近年来,越来越多的证据^[13-14]表明,靶向铁死亡有望克服对传统化疗、靶向治疗及免疫治疗的耐药性,这为开发基于诱导铁死亡机制的新型抗肿瘤疗法提供了理论依据和应用前景。研究发现,DLBCL细胞对DOX的耐药性与铁死亡密切相关。例如,脂肪酸合酶促进DLBCL细胞增殖并诱导DOX耐药性产生,该效应是通过抑制铁死亡实现的^[15]; DLBCL患者中SH3GL1表达升高与不良预后相关,其通过调节铁蛋白重链1介导的铁死亡促进肿瘤细胞DOX耐药^[16]。本研究结果显示,DOX耐药DLBCL细胞SU-DHL-4/DOX中ACTL6A表达上调,提示ACTL6A可能参与DOX诱导的细胞死亡过程;敲减ACTL6A表达可诱导SU-DHL-4/DOX细胞铁死亡,逆转SU-DHL-4/DOX细胞对DOX的耐药性。上述结果强调了ACTL6A在化疗耐药细胞铁死亡调控中的关键作用,为DLBCL耐药机制的深入理解及靶向干预提供了新的思路。

SWI/SNF复合物作为染色质重塑复合体之一,通常发挥抑肿瘤作用。然而,该复合物的蛋白质亚基在多种肿瘤中常发生突变或缺失,从而为肿瘤的发生发展提供了有利条件^[17]。ACTL6A最初被发现能与 β -肌动蛋白协同作用,通过影响Brahma相关基因1(brahma-related gene 1, Brg1)和SWI/SNF复合物的稳定性,间接调控细胞增殖和细胞周期进程^[18]。然

而,ACTL6A也可独立于SWI/SNF复合物发挥作用,促进肿瘤进展。文献^[19]报道,ACTL6A通过与p21启动子相互作用,在头颈部鳞状细胞癌和表皮鳞状细胞癌中诱导细胞周期停滞。ACTL6A还能够与c-Myc、Yes相关蛋白(yes-associated protein, YAP)、液泡蛋白分选相关蛋白72(vacuolar protein sorting-associated protein 72, VPS72)等相互作用,维持肿瘤干细胞的自我更新能力,并促进肿瘤细胞迁移能力^[20];此外,ACTL6A可促进顺铂诱导的DNA损伤修复,从而增强肿瘤细胞对顺铂的耐药性,而抑制其表达则可逆转该耐药表型^[21]。本研究结果显示,ACTL6A在SU-DHL-4/DOX细胞中的表达水平显著高于其亲本细胞系SU-DHL-4,提示ACTL6A可能参与DLBCL细胞对DOX的耐药机制;进一步敲减ACTL6A表达后发现,细胞中GPX4表达也下调,同时细胞内 Fe^{2+} 水平升高、脂质过氧化物累积、ROS水平、MDA含量升高、GSH含量下降等,表明ACTL6A可能通过调节GPX4的表达,抑制铁死亡,从而维持DLBCL细胞的药物耐受性。

研究^[22]表明,铁死亡受多种关键调控因子的影响。GPX4是铁死亡内源性途径的关键分子,作为一种抗氧化酶,其通过利用GSH将脂质过氧化物转化为脂质醇,从而减轻脂质过氧化反应并抑制铁死亡的发生。GPX4在肿瘤细胞表达增加与肿瘤发生和转移显著相关,抑制其表达可诱导肿瘤细胞铁死亡,进而抑制肿瘤的生长^[23];此外,GPX4在肿瘤细胞对化疗的耐药机制中也发挥重要作用。例如,Krüppel样因子11(Krüppel-like factor 11, KLF11)通过抑制

GPX4 表达促进肺腺癌细胞铁死亡, 从而抑制其增殖并增强对化疗药物的敏感性^[24]; 有研究^[25]发现, 靶向 GPX4 可克服 B-Raf 原癌基因丝氨酸/苏氨酸激酶 (B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase, BRAF) 抑制剂联合或不联合表皮生长因子受体抑制剂治疗结直肠癌细胞所产生的耐药性, 并诱导耐药细胞铁死亡。然而, DLBCL 中通过调控 GPX4 影响铁死亡的分子机制仍有待进一步研究。本研究结果表明, GPX4 是 ACTL6A 的下游转录调控分子, ACTL6A 能够促进 GPX4 的表达, 进而抑制铁死亡; 通过联合 GPX4 过表达实验进一步证实了其在 ACTL6A 介导的 DOX 耐药中的关键作用, 即敲低 ACTL6 表达促进 SU-DHL-4/DOX 细胞铁死亡, 而 GPX4 的过表达可部分逆转该效应, 提高 DOX 处理下 SU-DHL-4/DOX 细胞的存活率, 并抑制铁死亡过程。提示, ACTL6A 可能通过表观遗传机制调控 GPX4 的转录, 从而维持 DLBCL 细胞 DOX 耐药。

综上所述, 本研究结果揭示了 ACTL6A 可能是 DLBCL 细胞 DOX 耐药的一个重要分子, 其通过上调 GPX4 表达抑制铁死亡, 从而促进 DLBCL 细胞对 DOX 耐药。这一发现加深了对 DLBCL 耐药分子机制的理解, 也为逆转肿瘤耐药提供了新靶点和新思路。

[参考文献]

- [1] SHI Y F, XU Y, SHEN H F, et al. Advances in biology, diagnosis and treatment of DLBCL[J]. *Ann Hematol*, 2024, 103(9): 3315-3334. DOI:10.1007/s00277-024-05880-z.
- [2] QUALLS D, ARMAND P, SALLES G. The current landscape of frontline large B cell lymphoma trials[J]. *Blood*, 2025, 145(2): 176-189. DOI:10.1182/blood.2023023789.
- [3] KARSTEN I E, SHUMILOV E, SCHMITZ N, et al. Sequencing of therapy for patients with diffuse large B cell lymphoma in the era of novel drugs[J]. *Br J Haematol*, 2024, 205(6): 2163-2174. DOI: 10.1111/bjh.19860.
- [4] LI Z H, ZHANG Y, JI M L, et al. Targeting ferroptosis in neuroimmune and neurodegenerative disorders for the development of novel therapeutics[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176: 116777. DOI:10.1016/j.biopha.2024.116777.
- [5] MAREMONTI F, TONNUS W, GAVALI S, et al. Ferroptosis-based advanced therapies as treatment approaches for metabolic and cardiovascular diseases[J]. *Cell Death Differ*, 2024, 31(9): 1104-1112. DOI:10.1038/s41418-024-01350-1.
- [6] LI J B, LIU J, ZHOU Z, et al. Tumor-specific GPX4 degradation enhances ferroptosis-initiated antitumor immune response in mouse models of pancreatic cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(720): eadg3049. DOI:10.1126/scitranslmed.adg3049.
- [7] LIU J, TANG D L, KANG R. Targeting GPX4 in ferroptosis and cancer: chemical strategies and challenges[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45(8): 666-670. DOI:10.1016/j.tips.2024.05.006.
- [8] WANG Q Y, CAO Z Z, WEI Y Z, et al. Potential role of SWI/SNF complex subunit actin-like protein 6A in cervical cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 724832. DOI:10.3389/fonc.2021.724832.
- [9] LIU Y, LIU Y S, LI Y, et al. High expression of ACTL6A leads to poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients through promoting malignant progression[J]. *Head Neck*, 2024, 46(6): 1450-1467. DOI:10.1002/hed.27742.
- [10] LI X F, LUO S P, FU W F, et al. Discovery of a proliferation essential gene signature and actin-like 6A as potential biomarkers for predicting prognosis and neoadjuvant chemotherapy response in triple-positive breast cancer[J]. *Cancer*, 2024, 130(S8): 1435-1448. DOI:10.1002/cncr.35228.
- [11] YANG Z Q, ZOU S M, ZHANG Y J, et al. ACTL6A protects gastric cancer cells against ferroptosis through induction of glutathione synthesis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4193. DOI: 10.1038/s41467-023-39901-8.
- [12] QING K, JIN Z, XU Z Z, et al. Dysregulated MDR1 by PRDM1/Blimp1 is involved in the doxorubicin resistance of non-germinal center B cell-like diffuse large B cell lymphoma[J]. *Chemotherapy*, 2022, 67(1): 12-23. DOI:10.1159/000520070.
- [13] 罗书林, 杨斐斐, 徐燕丽. 铁在淋巴细胞和浆细胞疾病中的作用机制[J]. *中国实验血液学杂志*, 2025, 33(2): 601-605. DOI: 10.19746/j.cnki.issn1009-2137.2025.02.044.
- [14] GUAN X Y, GUAN X L, ZHU J R. Mechanisms and applications of ferroptosis-associated regulators in cancer therapy and drug resistance[J]. *J Chemother*, 2023, 35(8): 671-688. DOI: 10.1080/1120009X.2023.2177808.
- [15] ZHONG X, ZHANG W W, ZHANG W M, et al. FASN contributes to ADM resistance of diffuse large B cell lymphoma by inhibiting ferroptosis via nf- κ B/STAT3/GPX4 axis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2024, 25(1): 2403197. DOI:10.1080/15384047.2024.2403197.
- [16] DUAN Z W, WANG W T, WANG Y, et al. SH3GL1-activated FTH1 inhibits ferroptosis and confers doxorubicin resistance in diffuse large B cell lymphoma[J]. *Clin Transl Med*, 2025, 15(3): e70246. DOI:10.1002/ctm2.70246.
- [17] WANG L Y, TANG J L. SWI/SNF complexes and cancers[J]. *Gene*, 2023, 870: 147420. DOI:10.1016/j.gene.2023.147420.
- [18] CHANG C Y, SHIPONY Z, LIN S G, et al. Increased ACTL6A occupancy within mSWI/SNF chromatin remodelers drives human squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(24): 4964-4978.e8. DOI:10.1016/j.molcel.2021.10.005.
- [19] SHRESTHA S, ADHIKARY G, NASELSKY W, et al. ACTL6A suppresses p21Cip1 tumor suppressor expression to maintain an aggressive mesothelioma cancer cell phenotype[J]. *Oncogenesis*, 2021, 10: 70. DOI:10.1038/s41389-021-00362-7.
- [20] TSAI K K, CHENG L H, HSU C C, et al. Emerging roles of ACTL6A as an oncogenic hub: transcriptional regulation and beyond[J]. *Mol Cancer Res*, 2025, 23(6): 485-493. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-25-0059.
- [21] XIAO Y, LIN F T, LIN W C. ACTL6A promotes repair of cisplatin-induced DNA damage, a new mechanism of platinum resistance in cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(3): e2015808118. DOI:10.1073/pnas.2015808118.
- [22] LIANG D G, FENG Y, ZANDKARIMI F, et al. Ferroptosis

- surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones[J]. *Cell*, 2023, 186(13): 2748-2764. e22. DOI: 10.1016/j.cell.2023.05.003.
- [23] 韩静雅, 段亚涛, 张晓宇, 等. 肾细胞癌组织中 GPX4 的表达及其对 ACHN 细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(22): 4105-4109. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2023.22.002.
- [24] ZHAO G Y, LIANG J Q, SHAN G Y, et al. KLF11 regulates lung adenocarcinoma ferroptosis and chemosensitivity by suppressing GPX4[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 570. DOI: 10.1038/s42003-023-04959-z.
- [25] ZHAO Z, HE J S, QIU S H, et al. Targeting PLK1-CBX8-GPX4 axis overcomes BRAF/EGFR inhibitor resistance in BRAFV600E colorectal cancer *via* ferroptosis[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 3605. DOI:10.1038/s41467-025-58992-z.

[收稿日期] 2025-08-26

[修回日期] 2026-02-11

[本文编辑] 向正华