

HES1通过铁死亡调控胃癌细胞对赫赛汀耐药的机制研究

张金花^{1,2#}, 常晋霞^{3#}, 汤建才³, 刘文虎^{1,2*}

(1. 川北医学院药学院, 四川 南充 637100; 2. 川北医学院科技创新中心, 四川 南充 637100;
3. 川北医学院基础医学与法医学院, 四川 南充 637100)

摘要: 肿瘤耐药是导致化疗失败的主要原因, 而基因突变或功能缺失是引起耐药的关键因素。前期研究显示, SPLIT 多毛增强子 1 (hairy and enhancer of SPLIT1, HES1) 在赫赛汀耐药胃癌细胞中表达上调, 抑制其活性可逆转其耐药, 其机制尚未明确。本研究以赫赛汀耐药胃癌细胞 NCI N87R 为对象, 基于 CRISPR/Cas9 构建 HES1 敲除细胞 (Δ HES1/NCI N87R), 探究 HES1 在胃癌赫赛汀耐药中的潜在作用。采用定量蛋白质组学分析 Δ HES1/NCI N87R 细胞蛋白质表达谱; 基于基因集富集分析 (GeneSet Enrichment Analysis, GSEA) 和 Metascape 数据库进行基因本体分析; 利用 GeneAnalytics 进行通路富集分析, 并通过免疫印迹和抑制剂对筛选分子及通路研究。结果显示, 相比 NCI N87R 细胞, Δ HES1/NCI N87R 对赫赛汀的抗药性降低; 敲除 HES1 使 NCI N87R 细胞 1 263 种基因表达改变, 其中上调 761 种, 下调 502 种, 且铁死亡、脂肪酸 β -氧化、自噬、谷胱甘肽代谢等多条通路显著变化。功能研究显示, Δ HES1/NCI N87R 细胞铁离子和丙二醛浓度增加, 而谷胱甘肽降低, 进一步发现, 铁死亡抑制剂 Fer-1 能够逆转 Δ HES1/NCI N87R 中 pTP53、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的表达, 且降低对赫赛汀的敏感性, 提示 HES1 通过 TP53/SLC7A11/GPX4 通路参与调控 NCI N87R 细胞对赫赛汀耐药, 靶向 HES1 介导的 TP53/SLC7A11/GPX4 信号轴可能是逆转胃癌赫赛汀耐药的潜在策略。

关键词: SPLIT 多毛增强子 1; 赫赛汀; 抗药性; 蛋白质组学; 铁死亡; TP53/SLC7A11/GPX4

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3354-12

Mechanism of HES1 regulating herceptin resistance in gastric cancer cells by ferroptosis

ZHANG Jin-hua^{1,2#}, CHANG Jin-xia^{3#}, TANG Jian-cai³, LIU Wen-hu^{1,2*}

(1. Department of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China; 2. Innovation Centre for Science and Technology, Nanchong 637100, China; 3. School of Basic Medical Sciences and Forensic Medical, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China)

Abstract: Drug resistance of cancer cells is the main causes of chemotherapy failure, and gene mutation or function loss is key factor to induce drug resistance. Previous studies have shown that hairy and enhancer of split 1 (HES1) is up-regulated in herceptin-resistant gastric cancer cells, and inhibition of its activity can reverse its resistance while the potential mechanism has not yet been elucidated. In this study, we employed CRISPR/Cas9 to establish HES1 knock-out cell line (Δ HES1/NCI N87R) to investigate the functions of HES1 in herceptin resistance of NCI N87R cells and its potential mechanisms. We investigated proteomics profiling of Δ HES1/NCI N87R cells based on quantitative proteomics. Gene ontology analysis was conducted by GeneSet Enrichment

收稿日期: 2023-04-06; 修回日期: 2023-06-02.

基金项目: 四川省应用基础科研项目 (2019YJ0378); 川北医学院重点发展项目 (CBY22-ZDA01); 南充市市校合作项目 (19SXHZ0298).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-817-3373323, E-mail: wh_liu@csu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0420

Analysis (GSEA) and Metascape database, and pathway enrichment analysis was done using GeneAnalytics database. The selected molecules were quantified by Western blot and some pathways were verified by using inhibitors. The results showed that the resistance to herceptin of Δ HES1/NCI N87R cells decreased compared to NCI N87R cells. Proteomic data demonstrated that the expression of 1 263 genes changed significantly in Δ HES1/NCI N87R cells, among which 761 genes were up-regulated while 502 ones down-regulated comparing with NCI N87R cells. Pathway analysis showed that ferroptosis, fatty acid β -oxidation, autophagy and glutathione metabolism, etc. exhibited notable changes in Δ HES1/NCI N87R cells. The functional studies showed that the levels of iron ion and malondialdehyde increased, and glutathione decreased in Δ HES1/NCI N87R cells. It was further found that Fer-1, a ferroptosis inhibitor, could reverse the expression of pTP53, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in Δ HES1/NCI N87R cell, and reduce the sensitivity of Δ HES1/NCI N87R cells to herceptin. It is suggested that HES1 regulated the resistance of NCI N87R cells to herceptin through TP53/SLC7A11/GPX4 signaling pathway, and targeting TP53/SLC7A11/GPX4 signal axis mediated by HES1 is a potential strategy to reverse herceptin resistance in gastric cancer.

Key words: hairy and enhancer of SPLIT1; herceptin; resistance; proteomics; ferroptosis; TP53/SLC7A11/GPX4

肿瘤耐药是临床化疗过程中的普遍现象,也是导致化疗失败的主要原因。肿瘤耐药机制与基因突变或缺失、信号通路异常等有关^[1,2]。人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2) 是由 *erbB2* 基因编码的癌基因,其过表达不仅与胃癌的发生发展相关,而且是一个重要的化疗和预后指标^[3,4]。赫赛汀/曲妥珠单抗是抗 HER-2 单克隆抗体药物,通过结合 HER-2 阻止癌细胞的增殖。尽管 HER2 阳性胃癌患者在赫赛汀化疗中获益,但肿瘤细胞获得性耐药仍不可避免。因此,探究胃癌细胞对赫赛汀耐药机制,发现耐药靶标,对提高化疗效果具有重要意义。

SPLIT 多毛增强子 1 (hairy and enhancer of SPLIT1, HES1) 是一类 DNA 结合蛋白超家族成员,对细胞分化具有促进作用^[5]。HES1 通过结合基因启动子区域特定定位点发挥转录激活/抑制双重功能,然而其调控机制并不清楚。近年来研究显示, HES1 过表达与肿瘤恶性行为及耐药有关。HES1 通过促进结肠癌干细胞自我更新能力和致瘤性促进其转移,且 HES1 诱导上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 和 ABC 转运蛋白促进结直肠癌对 5-氟尿嘧啶耐药^[6]。使用 γ -分泌酶抑制剂抑制 HES1 活性,能够提高紫杉醇对卵巢癌化疗的敏感性^[7]。本课题组前期研究发现^[8], HES1 在赫赛汀耐药胃癌细胞中高表达,特异性敲除 HES1 抑制其活性,可有效逆转其耐药,提示 HES1 可能参与调控胃癌赫赛汀耐药,然而具体机制尚未明确。

本研究以赫赛汀耐药胃癌细胞 (NCI N87R) 为对象,基于 CRISPR/Cas9 构建 HES1 特异性敲除细胞 (Δ HES1/NCI N87R),基于定量蛋白质组学研究 Δ HES1/NCI N87R 细胞蛋白质表达谱的变化,通过生

物信息学分析 Δ HES1/NCI N87R 细胞信号通路的改变,结合功能研究阐释 HES1 在胃癌赫赛汀耐药中的潜在机制。

材料与方法

主要仪器 LTQ Orbitrap Velos Pro 轨道阱质谱仪、Easy-nLC 2000 nano 液相色谱系统、细胞培养箱 (Thermo Fisher 公司); 2695HPLC 液相色谱系统 (Waters 公司); SP8 荧光显微镜 (Leica 公司); 化学发光成像系统 (Tanon 公司); 电泳仪 (Bio-Rad 公司); 多功能超声仪 (Sonics 公司); 5810R 真空浓缩仪 (Eppendorf 公司)。

细胞与试剂 胃癌细胞 NCI N87 由国家蛋白质组科学研究中心惠赠; 赫赛汀耐药细胞 (NCI N87R) 及 Δ HES1/NCI N87R 为自建细胞系。凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK (HY-16658B)、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA, HY-19312) 及铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 (Fer-1, HY-100579) 购于 MedChemExpress 公司; 谷胱甘肽、丙二醛检测试剂盒、DMEM 培养基、胰酶及抗兔/鼠二抗购于 Beyotime 生物科技公司; 铁离子检测试剂盒 (I291) 和 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (CK04) 购于日本同仁化学研究所; 蛋白定量试剂盒 (MA0081, 大连美仑生物技术); 赫赛汀 (罗氏制药); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco 公司); 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、尿素、甲醇、乙腈和甲酸 (Thermo Fisher 公司); 抗体 TP53 (60283-2)、pTP53 (28961-1-AP)、SLC7A11 (26864-1-AP)、GPX4 (14432-1-AP) 及磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate

dehydrogenase, GAPDH, 60004-1) 购于 Proteintech 公司; Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); BsmBI (NEB 公司); T4连接酶(TAKARA 公司)。

细胞培养 细胞 NCI N87、NCI N87R 及 Δ HES1/NCI N87R 按照文献^[9,10]培养。

向导 RNA (sgRNA) 的设计及构建 采用 <http://www.e-crisp.org> 设计靶向 *HES1* 基因的 sgRNA 序列, 选取打分前两位的 sgRNA, 分别为 sgRNA1 和 sgRNA2。sgRNA1 正向 5'-CACCGGAGAAAATTCC-TCGTCCC-3', 反向 5'-AAACGGGACGAGGAATTTT-TCTCC-3'; sgRNA2 正向 5'-CACCGGTAGCAGCA-CCGGGGACG-3', 反向 5'-AAACCGTCCCCGGTGG-CTGCTACC-3'。序列由华大基因合成, 并通过 T4 连接酶连入 U6-sgRNA-SFFV-spCas9-puro 质粒。

细胞转染及筛选 将 1 μ g pMD 2. G、1.5 μ g psPAX2 和 2 μ g Cas9 质粒与 15 μ L Lipofectamine 2000 混合, 将其加入融合度约 80% 的 293T 细胞, 孵育 8 h 除去含质粒的培养基, PBS 清洗 1 次, 加入新鲜培养液培养 48 h, 3 000 \times g 离心 10 min, 收集含病毒颗粒的细胞上清, -20 $^{\circ}$ C 保存。NCI N87R 细胞按每毫升 1×10^5 个接种于 6 孔板, 培养至细胞融合度约 70% 时加入慢病毒, 48 h 后加入 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 嘌呤霉素培养 72 h, 流式分选单细胞, 扩大培养。

细胞活力测定 将 NCI N87、NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞分别按 5 000 个/孔接种于 96 孔板中, 按文献^[10,11]检测细胞活力。

抑制剂干预 Δ HES1/NCI N87R 细胞对赫赛汀抗药性的影响 将对数期生长的 Δ HES1/NCI N87R 细胞接种于 96 孔板中, 每孔含细胞数为 5 000 个, 培养过夜 (含 80 μ g \cdot mL⁻¹ 赫赛汀), 分别加入 8 μ mol \cdot L⁻¹ 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK、16 μ mol \cdot L⁻¹ 自噬抑制剂 3-MA 和 5 μ mol \cdot L⁻¹ 铁死亡抑制剂 Fer-1, 细胞培养 48 h, 利用 CCK-8 检测抑制剂干预 Δ HES1/NCI N87R 细胞对赫赛汀敏感性的变化。

免疫荧光实验 对数期 NCI N87、NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞分别用 PBS 清洗 3 次, 按文献^[10]进行免疫荧光实验。

透射电镜 对数期 NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞, 分别用 2.5% 戊二醛固定过夜。PBS 洗 3 次, 每次 10 min。1% 锇酸后固定 1 h。PBS 洗 2 次。依次放入水、70%、90% 乙醇脱水 10 min, 再用等体积 90% 乙醇/90% 丙酮、丙酮分别脱水 10 min。用 Epon812 包埋剂与丙酮 (v/v = 1:1) 浸泡 1 h, 再按 1:3 浸泡过夜。60 $^{\circ}$ C 烘箱聚合 24 h。切片、捞片, 醋酸铀和枸橼酸铅分别染色 30 min, 室温干燥, 拍片。

铁离子检测 对数期 NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞悬液各 5 mL, 取 0.5 mL 用 BCA 法测蛋白浓度, 剩余 4.5 mL 离心后用 100 μ L assay buffer 重悬, 快速冻融 3 次, 冰上裂解 10 min, 3 000 \times g 离心 10 min, 上清待用。于 96 孔板中每孔加入 100 μ L 待测上清和 5 μ L assay buffer, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 每孔加铁离子探针 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h, 检测 593 nm 处的吸光度, 根据铁浓度-吸光度标准曲线计算铁离子浓度。

谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测 将对数期 NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞, 按 3×10^5 个/孔分别接种到 6 孔板中, 待细胞至融合度约 50% 时, 加入细胞沉淀 3 倍体积的蛋白去除剂 S 溶液。细胞快速冻融 3 次, 12 000 \times g 离心 10 min, 上清用于 GSH 测定。按照试剂盒要求检测 412 nm 处吸光度, 根据标准曲线计算 GSH 含量。

丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测 将对数期 NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞 (2×10^6 个) 用 PBS 重悬, 低温超声裂解, BCA 法测定蛋白浓度, 配置 MDA 工作液。取 100 μ L 样品与 1 mL 工作液混匀, 95 $^{\circ}$ C 加热 1 h 冷却至室温, 6 000 \times g 离心 10 min, 取上清。取 200 μ L 加入 96 孔板, 酶标仪检测 532 nm 吸光度, 根据吸光度及蛋白浓度计算 MDA。

免疫印迹实验 (Western blot) 收集对数期 NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞, 按文献^[10]进行免疫印迹实验。一抗 TP53、pTP53、SLC7A11、GPX4 及 GAPDH 分别稀释 1 000 倍, 二抗稀释 3 000 倍; 使用 Image J 进行灰度值计算, GraphPad Prism 8.04 定量分析。

色谱条件 Easy nLC 2000 纳升高效液相色谱系统, 搭载反相 C18 分离柱 (2 cm \times 100 μ m \times 3 μ m) 和 C18 分析柱 (15 cm \times 75 μ m \times 3 μ m, 美国 Thermo Fisher 公司)。流动相 A: 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B: 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 洗脱梯度为: 0~5 min, 0~5% B; 6~90 min, 6%~35% B; 91~110 min, 36%~98% B; 111~120 min, 2% B; 流速 200 nL \cdot min⁻¹。

质谱检测 LTQ-Orbitrap Velos Pro 型质谱仪, 纳升级电喷雾离子源, 电压 2.5 kV, 离子传输毛细管温度 300 $^{\circ}$ C, Orbitrap 扫描质荷比 (*m/z*) 300~2 000, MS 扫描分辨率为 30 000, 选取丰度最高的 Top 20 离子 MS/MS 分析, 分辨率为 7 500, MS/MS 碎裂模式为碰撞诱导解离 (CID), 归一化碰撞能 (NCE) 为 35%。动态排除时间 40 s, 重复次数 1, 重复持续时间 30 s, 排除列表 50, 排除离子时间 180 s。

细胞蛋白质提取、还原烷基化及 FASP 酶切 对数期细胞用 PBS 漂洗 2 次, 加入 8 mol \cdot L⁻¹ 尿素, 震荡后

冰上裂解 10 min, 超声 2 min, 4 °C、12 000 ×g 离心 10 min, 取上清, Bradford 法测定蛋白浓度。

还原烷基化及 FASP 酶切按照文献方法^[12]。

肽段分离及检测 肽段经 Waters 2695 HPLC 液相系统分离, 流动相 A: 水, 流动相 B: 乙腈, 洗脱梯度为: 0~34 min, 0~98% B; 35~40 min, 98% B, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 收集洗脱液, 按下列顺序合并洗脱液: ① 1、6、11、16、21; ② 2、7、12、17、22; ③ 3、8、13、18、23; ④ 4、9、14、19、24; ⑤ 5、10、15、20、25; ⑥ 26~30; ⑦ 31~35; ⑧ 36~40, 减压浓缩, 质谱待检。

蛋白质定量分析及差异表达基因筛选 肽段经 0.1% 甲酸复溶后, 于 12 000 ×g 离心 10 min, 上清经 Easy-nLC 2000 nano 分离进入 LTQ Orbitrap Velos Pro 质谱, 采用 Proteome Discover 1.4 软件搜库, 检索参数为: 母离子质量公差 20 ppm, 子离子 0.5 Da。蛋白质修饰设定为: 半胱氨酸脲甲基化为固定修饰, 蛋氨酸 N-乙酰化及氧化为动态修饰, 肽段水平错误发现率 (false discovery rate, FDR) 小于 1%。

基于数据依赖分析 (data dependence analysis, DDA) 采集数据, 按总面积进行归一化定量, 方法为蛋白峰面积除以样本全部蛋白峰面积之和, 再将所有相对峰面积扩大 10⁵ 倍。肽段筛选标准为: 每个蛋白质被检测到的特异性肽段数 ≥ 1, Mascot ≥ 20。基于差异倍数 (fold change, FC) 及 *t* 检验筛选差异表达基因, 若某基因表达在两组样本中的均值之比 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67, 且 *P* < 0.05, 认为该基因在两样本中的表达具有显著差异。

统计学分析 数据用均数 ± 标准误 (mean ±

SEM) 表示。采用 SPSS 26.0 进行统计学分析, 组间均值比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义, *P* < 0.01 表示差异具有显著统计学意义, *P* < 0.001 表示差异具有极显著统计学意义。定量作图采用 GraphPad Prism 8.0。生物信息学作图采用 RStudio (version 3.6.2)。

结果

1 ΔHES1/NCI N87R 细胞的构建及评价

Western blot 显示, 设计的两条 sgRNA 序列中, 其中 sgRNA1 能够引导 Cas9 高效切割靶基因 (图 1A), 以此构建的细胞命名为 ΔHES1/NCI N87R。进而采用 Western blot 检测 NCI N87R 和 ΔHES1/NCI N87R 细胞中 HES1 的水平, 显示 HES1 在 ΔHES1/NCI N87R 中不表达 (图 1B)。蛋白质组数据表明, 与对照组相比, HES1 在 ΔHES1/NCI N87R 中的相对平均峰面积下降了 99.92% (图 1C), 表明 ΔHES1/NCI N87R 细胞构建成功。CCK-8 显示, 在实验指定剂量下, 细胞活力-药物浓度呈剂量依赖关系 (图 1D)。与 NCI N87R 相比, ΔHES1/NCI N87R 细胞对赫赛汀的抗药性降低 (*P* < 0.05)。赫赛汀对 NCI N87、NCI N87R 及 ΔHES1/NCI N87R 的 IC₅₀ 分别为 147.5、614.1 和 401.3 μg·mL⁻¹, 且对 ΔHES1/NCI N87R 细胞的抑制能力较 NCI N87R 提高了 1.53 倍。免疫荧光显示, NCI N87 与 ΔHES1/NCI N87R 细胞表型相似, 而 NCI N87R 细胞具有上皮-间质转化特征 (epithelial to mesenchymal transition, EMT), 这与本课题组之前的研究结果相一致^[13] (图 1E)。

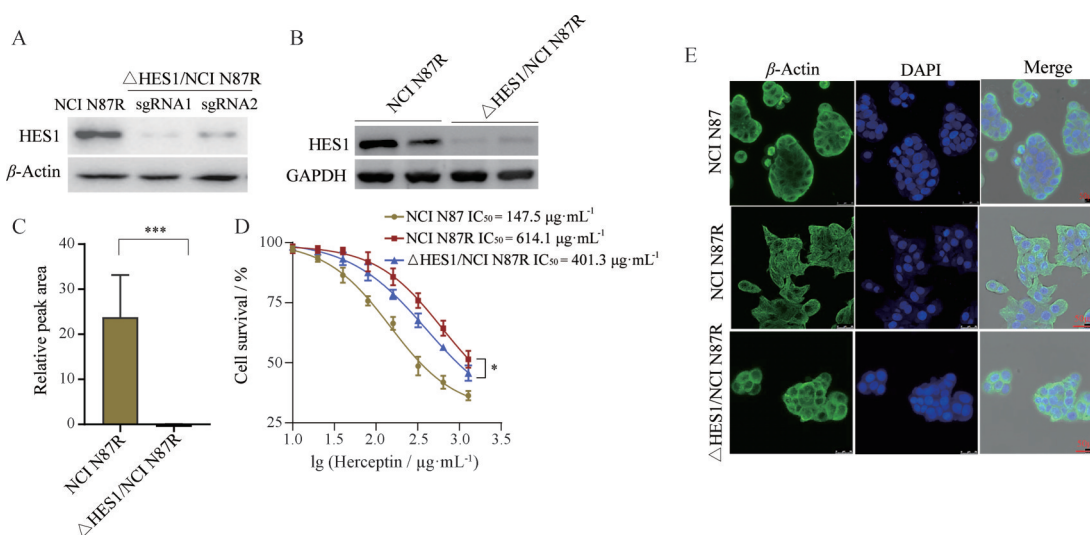


Figure 1 Establishment and evaluation of ΔHES1/NCI N87R cell line. A, B: HES1 was detected in NCI N87R and ΔHES1/NCI N87R cell lines by Western blot; C: HES1 was quantified by mass spectrometry; D: Cell viability of NCI N87, NCI N87R and ΔHES1/NCI N87R cell lines was detected by CCK-8 kit, respectively; E: The morphological comparison among NCI N87, NCI N87R and ΔHES1/NCI N87R cell lines after immunofluorescence, respectively. *n* = 3, mean ± SEM. **P* < 0.05, ****P* < 0.001. HES1: Hairy and enhancer of SPLIT

2 敲除 HES1 导致耐药细胞表达谱变化

基于定量蛋白质组学分析 NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞蛋白质表达谱, 在蛋白及肽段 FDR < 1% 条件下共鉴定到蛋白 6 095 个。根据经验将 3 个及以上样本中被检测到的蛋白 (共计 4 127 个) 纳入生信分析。主成分分析 (principal composition analysis, PCA) 显示, NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 分别沿主成分 1 (PC1) 和主成分 2 (PC2) 两个维度分开, PC1 与 PC2 之和能够解释组间 70.6% 的变异, 组内聚集良好, 组间明显区分 (图 2A)。聚类树图显示, NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 能够完全分组 (图 2B)。相关性分析表明, NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 组内相关系数 R^2 均大于 0.85 (图 2C)。热图显示, NCI N87R 和 Δ HES1/NCI N87R 细胞蛋白表达谱存在差异 (图 2D)。以上结果表明, 敲除 HES1 并抑制其活性对 NCI N87R 细胞蛋白质表达谱产生影响, 且 Δ HES1/NCI N87R 细胞的蛋白质谱较 NCI N87R 存在较明显不同。

3 差异表达基因筛选及 GSEA 富集分析

剔除样本中缺失值超过 50% 的变量, 其余缺失值采用 K-Nearest Neighbors (K = 10) 法回补, 然后对所有变量按样本总面积归一化。采用火山图筛选差异变量, Δ HES1/NCI N87R 细胞中表达上调的基因在火山图中标注为红色 ($FC \geq 1.5, P < 0.05$), 下调基因被标注为蓝色 ($FC \leq 0.67, P < 0.05$), 其余基因视为在两组中表达无显著差异, 标注为灰色 (图 3A)。结果显示, 共

有 1 263 种基因在 Δ HES1/NCI N87R 中表达改变, 其中上调 761 种, 下调 502 种。对差异表达基因按倍数变化排序, 表达上调倍数前 3 位基因分别为 MRPL41、FAU 和 CHMP5 等; 下调倍数前 3 位基因分别为 NKTR、SLC34A1 和 HES1 (图 3B)。值得注意的是: 铁蛋白重链分子 FTH1 和轻链分子 FTL、铁死亡相关基因 GPX4、SLC7A11、GCLM 和 GSS 在 Δ HES1/NCI N87R 中显著下调, 而 TP53、CASP1/4/8、mTOR、ATG7 和 ATG12 显著上调。热图趋势变化显示, 与 NCI N87R 相比, Δ HES1/NCI N87R 细胞中多数基因的表达上调, 其变化趋势归属于 2 个大的聚类 (cluster) (图 3C、D)。为更加全面了解 HES1 敲除对 NCI N87R 细胞基因集功能的影响, 在无须设定差异基因阈值的前提下, 本研究对 3 个及以上样本中被检测到的 4 127 个基因进行了 GSEA 分析。结果显示, 富集前 3 位的基因主要与铁死亡 ($P = 4.6 \times 10^{-4}, ES = 0.62$)、DNA 复制 ($P = 5.0 \times 10^{-4}, ES = -0.51$) 及 DNA 双链断裂修复 ($P = 1.1 \times 10^{-3}, ES = -0.54$) 功能有关 (图 3E), 且铁死亡信号呈正向激活, 而 DNA 复制及 DNA 双链断裂修复呈负向激活, 提示这些基因功能改变可能与 HES1 调控赫赛汀耐药有关。

4 差异表达基因功能注释

采用 Metascape 数据库对差异表达基因进行分群和网络构建, 对富集较高的基因进行功能注释, 并按照关联性和相似性构建网络。结果显示, 脂肪酸代谢

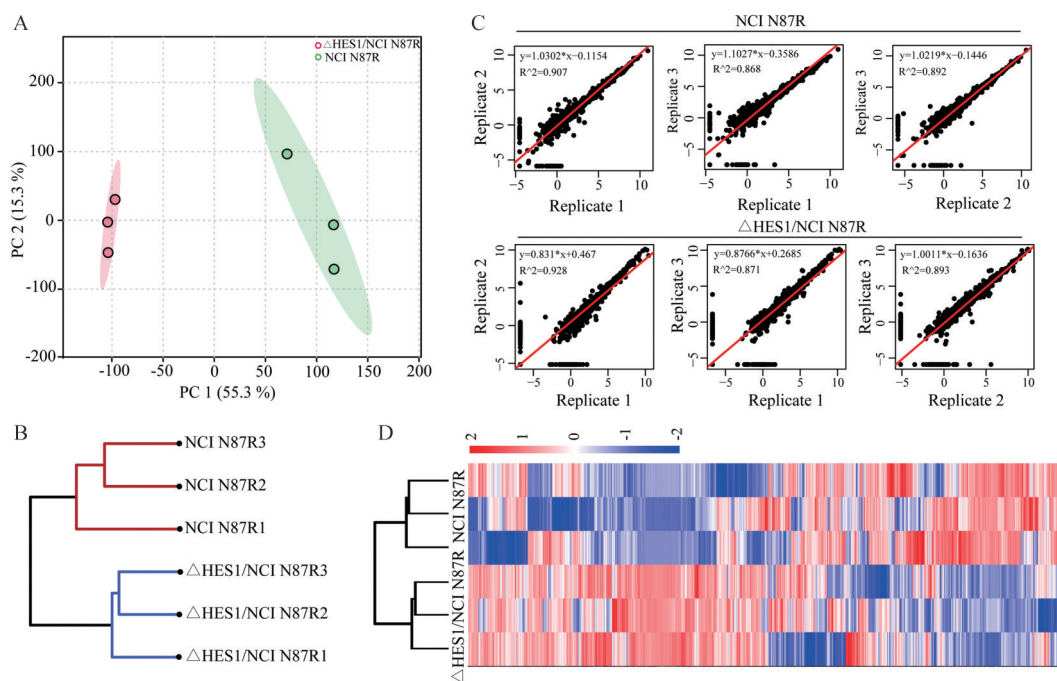


Figure 2 Proteomics profiling of NCI N87R and Δ HES1/NCI N87R cell lines. A: Principal component scores of NCI N87R and Δ HES1/NCI N87R cells, respectively; B: Dendrogram plot analysis of samples in two cell lines; C: Spearman's correlation coefficients analysis of NCI N87R and Δ HES1/NCI N87R samples; D: Comparison of heat map of proteomics profiling in two cell lines

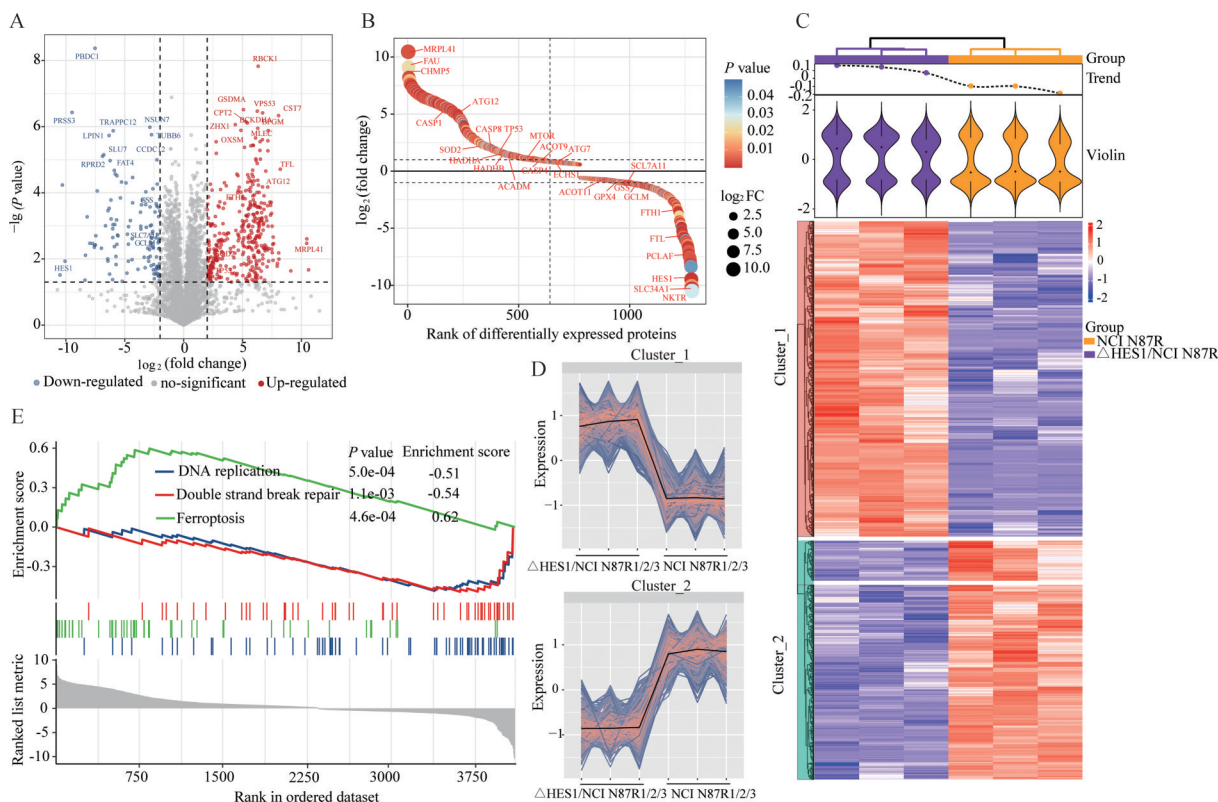


Figure 3 Identification and analysis of differentially expressed proteins. A: Differentially expressed proteins shown by volcano plot; B: Rank plot of differentially expressed proteins; C, D: Analysis of heat map and cluster of differentially expressed proteins; E: GSEA analysis of all genes. ES: Enrichment score

($\lg P = -35.11$)、依赖铁的程序性细胞死亡 ($\lg P = -34.91$)、脂肪酸 β -氧化 ($\lg P = -25.12$)、铁氧还蛋白代谢 ($\lg P = -25.08$)、细胞周期 ($\lg P = -24.65$)、谷胱甘肽代谢 ($\lg P = -22.54$) 和自噬 ($\lg P = -21.67$) 等生物学过程被高度富集。从功能看, 上述通路多与调控铁死亡相关, 其中直接相关通路包括依赖铁的程序性细胞死亡、谷胱甘肽代谢及铁氧还蛋白代谢; 间接相关通路包括脂肪酸 β -氧化、脂肪酸代谢及自噬等。此外, 三羧酸循环 ($\lg P = -20.03$)、NF- κ B ($\lg P = -19.81$)、细胞对活性氧的反应 ($\lg P = -18.36$)、线粒体凋亡 ($\lg P = -16.87$) 及氧化还原过程 ($\lg P = -15.58$) 等也显著变化 (图 4A、B), 这些信号与能量代谢 (三羧酸循环、NF- κ B、线粒体凋亡) 及氧化-还原状态 (细胞对活性氧的反应、氧化还原过程) 有关。综上所述, Δ HES1/NCI N87R 细胞中与铁死亡及氧化-还原状态相关的多条信号被高度富集, 提示铁死亡是 Δ HES1/NCI N87R 细胞的重要特征之一。

5 通路富集及定量分析

基于 GeneAnalytics 数据库对差异表达基因通路富集分析, 根据 P 值及 GeneRatio (GR), 对显著变化的通路可视化展示, 发现 16 条通路被富集 (图 5A), 其中

铁死亡 ($P = 3.5 \times 10^{-4}$, GR = 0.83)、脂肪酸 β -氧化 ($P = 5.1 \times 10^{-3}$, GR = 0.86)、谷胱甘肽代谢 ($P = 1.48 \times 10^{-3}$, GR = 0.51)、糖酵解/糖异生 ($P = 1.50 \times 10^{-3}$, GR = 0.51)、自噬 ($P = 6.2 \times 10^{-4}$, GR = 0.77)、三羧酸 (tricarboxylic acid, TCA) 循环 ($P = 5.2 \times 10^{-4}$, GR = 0.77) 及脂肪酸代谢 ($P = 5.3 \times 10^{-4}$, GR = 0.69) 显著改变。定量分析显示, Δ HES1/NCI N87R 细胞中, 铁死亡相关分子 TP53、VDAC2、SLC39A14 和 ATG7 的表达上调, 而 GSS、FTH1、SLC7A11、GPX4、FTL、GCLM、PCBP2、AIFM2、CISD1、SLC38A1、CTH、TXNRD1 和 SLC2A1 表达下调 (图 5B)。从生物学功能分析, VDAC2 为电压依赖性阴离子通道, 能够与 erastin 直接结合诱导脂质 ROS 的产生; 而 SLC39A14 为重要的金属离子转运蛋白, 其表达增加有助于铁离子转运进入细胞, 进而促进铁死亡。另一方面, 作为胞内抗氧化系统胱氨酸/谷氨酸反向转运体系统 (cystine/glutamate antiporter, system Xc-) 的亚基成员之一, SLC7A11 对胞内谷氨酸 (Glu) 和胞外胱氨酸 (Cys2) 交换起重要作用, 交换后的 Cys2 在 GCLM 和谷胱甘肽合成酶 (GSS) 催化下合成 GSH, 以维持胞内氧化-还原平衡, 数据显示 Δ HES1/NCI N87R 中 SLC7A11、GCLM 和 GSS 表达均降低, 提示

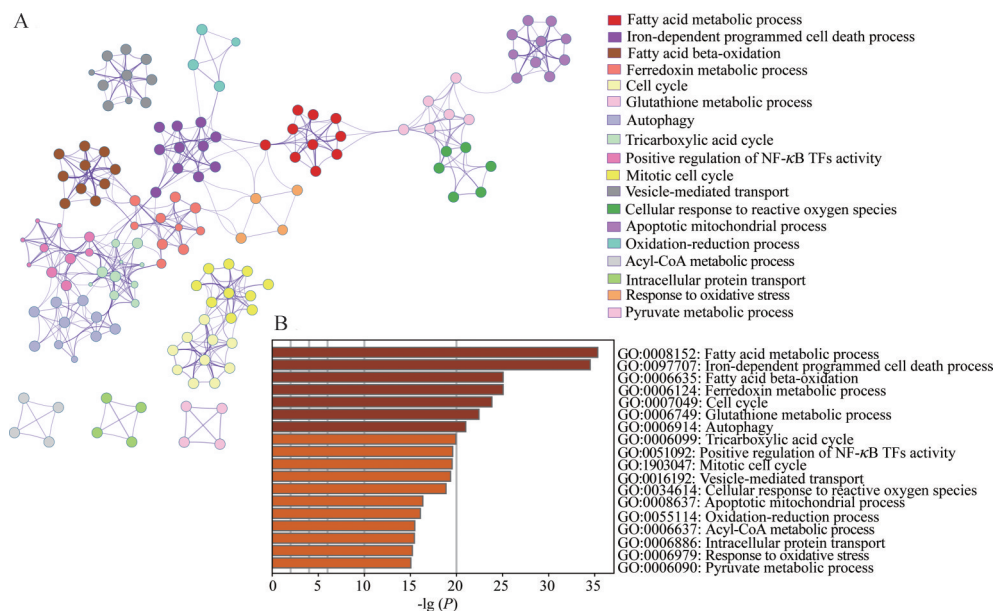


Figure 4 Gene ontology analysis of differential proteins involved in biological process. A: Enrichment results are displayed by network plot, sizes of nodes correspond to the degree of enrichment; B: Enrichment results are showed by P value

GSH水平下降, 谷胱甘肽过氧化物酶GPX4的活性降低。此外, 抗氧化分子硫氧还蛋白还原酶TXNRD1的表达下降, 细胞抗氧化能力降低, 为 Δ HES1/NCI N87R铁死亡创造了先决条件。脂肪酸 β -氧化主要发生在线粒体中, β -氧化可通过减少多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 的累积抑制脂质过氧化, 从而抑制铁死亡。本研究的数据显示, 脂肪酸 β -氧化中, 除了ACBD7和ACOT11上调外, 其余CPT1A、ECI1、ACADM、CPT2、HADHA、ACSF2、ACADVL、ECHS1、HADHB、ACAA2、ACOT9和SCP2在 Δ HES1/NCI N87R中的表达均显著下调(图5C), 提示 Δ HES1/NCI N87R脂肪酸 β -氧化能力降低, 胞内脂质积累, 这有助于激活铁死亡。谷胱甘肽代谢中, 抗氧化分子GSS、GPX4和GCLM表达均下调(图5D)。值得注意的是, 与TCA循环有关的分子, 包括PCK2、OGDH、SDHA、PDHB、CS、SUCLA2、IDH3B、SUCLG2、PC、ACO2和MDH2均上调(图5E); 与脂肪酸代谢有关的基因多数上调(图5F)。此外, 与自噬和凋亡相关的分子, 包括mTOR、ATG7和ATG12以及TP53、CASP1/4/8均上调(图5G、H)。综上所述, HES1对胃癌赫赛汀耐药具有复杂的调控作用, 敲除HES1使NCI N87R细胞多条通路显著改变, 其中与铁死亡相关的多条通路变化明显, 推测HES1可通过介导铁死亡调控NCI N87R细胞对赫赛汀耐药。

6 敲除HES1对耐药细胞形态及铁死亡的影响

电镜结果显示, 与耐药细胞相比, Δ HES1/NCI N87R细胞线粒体变小, 线粒体嵴减少或消失, 线粒体

膜密度增加或破裂, 线粒体颜色变深, 符合铁死亡形态学特征(图6A)。与对照组相比, Δ HES1/NCI N87R细胞中铁离子水平显著升高(图6B), 而GSH水平降低(图6C), 且脂质过氧化产物MDA提高了1.6倍(图6D), 这些结果与蛋白质组学数据相吻合。

7 抑制剂对 Δ HES1/NCI N87R细胞赫赛汀敏感性的影响

首先采用CCK-8评价抑制剂本身对 Δ HES1/NCI N87R细胞活力的影响。结果显示, 当Fer-1、Z-VAD-FMK及3-MA浓度分别不高于5、8和16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制剂对细胞活力无显著影响(图7A~C)。据此, 采用5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fer-1、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z-VAD-FMK和16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-MA联合赫赛汀处理 Δ HES1/NCI N87R细胞, 分析其对细胞活力的影响。与DMSO组相比, Fer-1和3-MA干预使赫赛汀对 Δ HES1/NCI N87R的细胞活力分别提高了1.1和1.03倍, 而Z-VAD-FMK干预对赫赛汀敏感性无显著影响(图7D), 表明抑制铁死亡一定程度上可增强 Δ HES1/NCI N87R细胞对赫赛汀的抗药性。

8 HES1通过TP53/SLC7A11/GPX4通路调控胃癌细胞对赫赛汀耐药

为了进一步研究HES1对NCI N87R细胞铁死亡的潜在调控机制, 采用Western blot分别检测了NCI N87R和 Δ HES1/NCI N87R细胞中TP53、磷酸化TP53(pTP53)、SLC7A11、GPX4的表达变化。结果显示, TP53和pTP53在 Δ HES1/NCI N87R细胞中表达上调, 且pTP53/TP53比值增加, 而SLC7A11和GPX4表达下

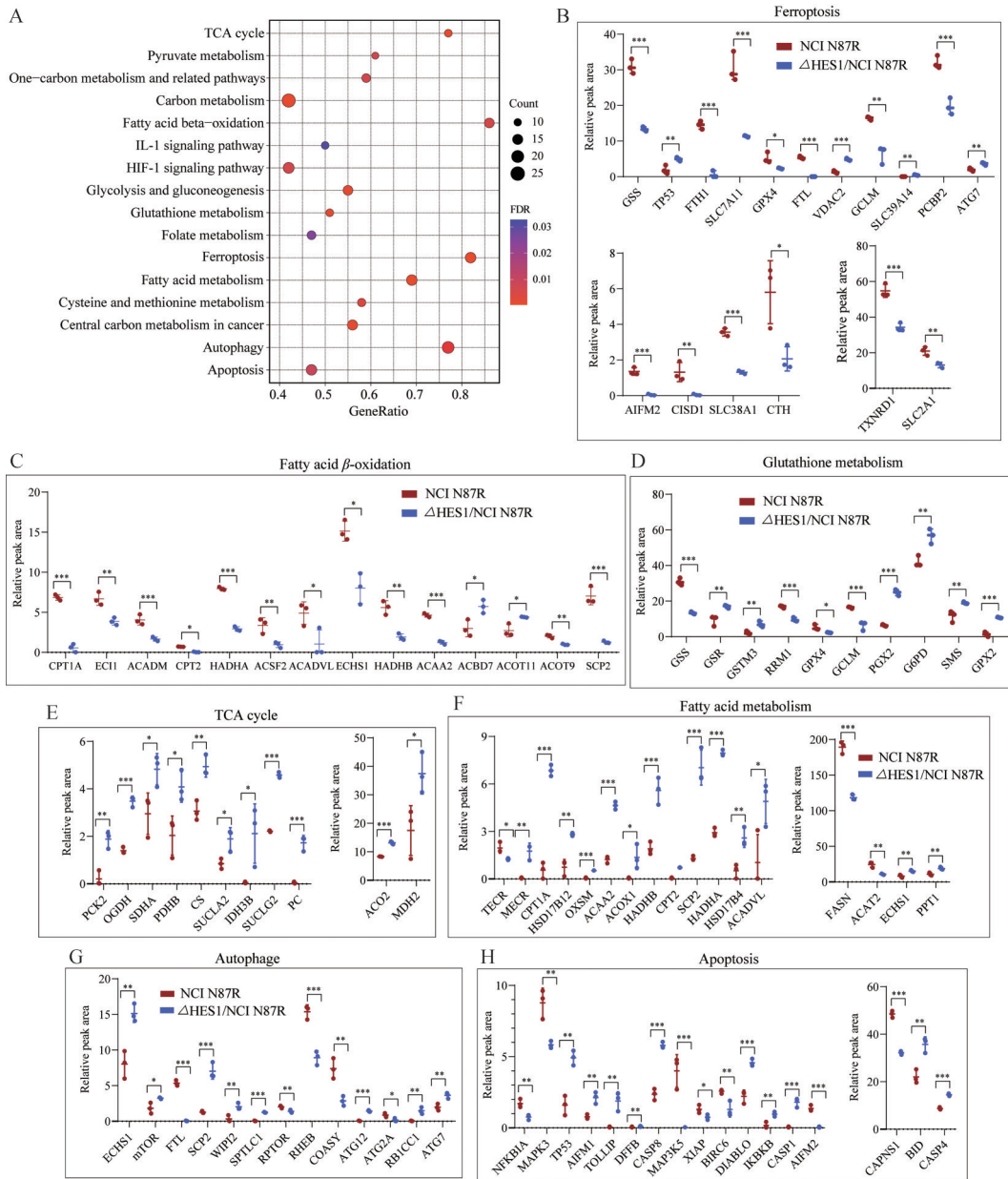


Figure 5 Enrichment analysis of signaling pathways of differentially expressed proteins. A: Bubble plot visualization of signaling pathways; B-H: Quantitative analysis of proteins in activated signaling pathways. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

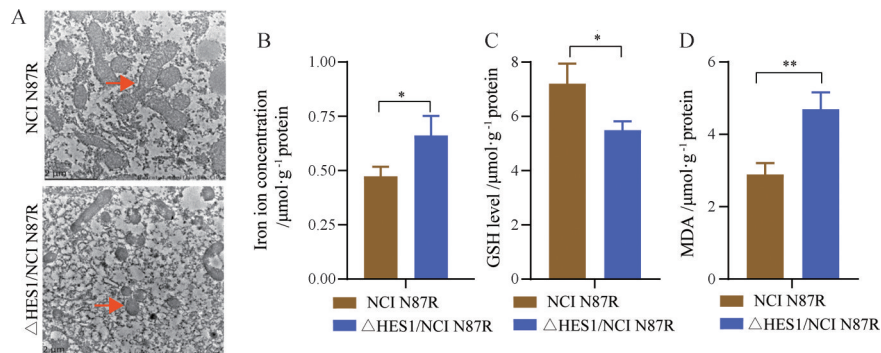


Figure 6 Morphology analysis and ferroptosis detection of Δ HES1/NCI N87R cell. A: The representative transmission electron microscopy image of mitochondria (red arrowheads) in NCI N87R and Δ HES1/NCI N87R cells. Bar: 2 μ m. Detection of iron ion concentration (B), glutathione (GSH, C) and malondialdehyde (MDA, D) level in NCI N87R and Δ HES1/NCI N87R cells. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

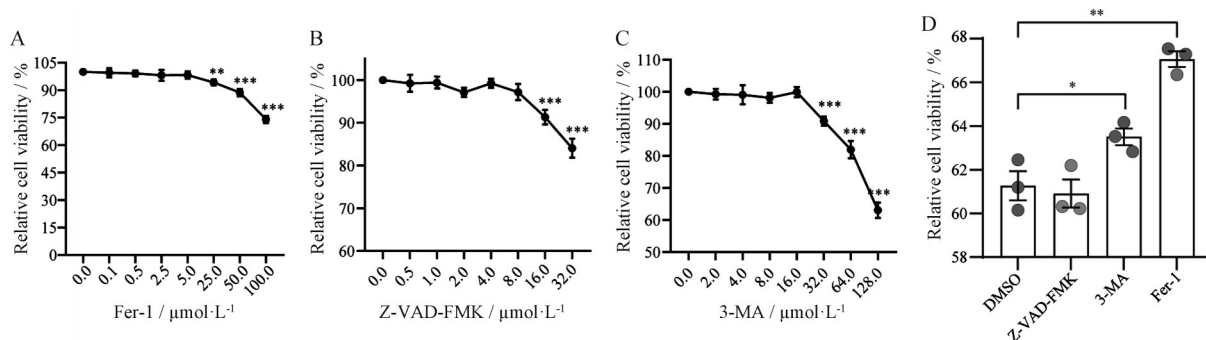


Figure 7 Effect of inhibitors on herceptin resistance in Δ HES1/NCI N87R cells. A–C: Relative cell viability of Δ HES1/NCI N87R cells in Fer-1, Z-VAD-FMK and 3-MA; D: Relative cell viability of Δ HES1/NCI N87R cells under different treatment factors. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl. 3-MA: 3-Methyladenine; Fer-1: Ferrostatin-1

调 (图 8A、B)。采用 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fer-1 干预 Δ HES1/NCI N87R 细胞后, 显示 pTP53、SLC7A11 和 GPX4 的表达被逆转, 且 pTP53/TP53 比值降低 (图 8C、D)。然而, 3-MA 对 pTP53 和 TP53 表达无显著影响 (图 8E、F), 提示 HES1 通过 TP53/SLC7A11/GPX4 信号轴调控胃癌细胞对赫赛汀耐药。

讨论

肿瘤获得性耐药与氧化应激能力增强、凋亡抵抗、基因突变等多种机制有关^[14-16]。氧化还原稳态改变是导致化疗失败和产生耐药的主要因素^[17]。铁死亡是细

胞内铁依赖的、由脂质过氧化积累驱动且与细胞代谢状态有关的细胞死亡方式。铁死亡不仅与氧化应激密切相关, 而且诱导铁死亡能够提高肿瘤化疗的有效性^[18,19]。因此, 研究铁死亡并探究与肿瘤耐药之间的关系, 将为肿瘤的精准确治疗提供指导。

HES1 是 Notch 信号通路下游靶基因。研究显示, 激活 Notch 信号有助于促进胃癌赫赛汀耐药^[20]。然而, HES1 在胃癌赫赛汀耐药中的作用尚不清楚。本课题组前期研究显示, 赫赛汀耐药胃癌细胞 NCI N87R 中 HES1 高表达, 抑制其表达能够逆转细胞耐药。蛋白质组学显示, 抑制 HES1 可诱导耐药细胞铁死亡、自

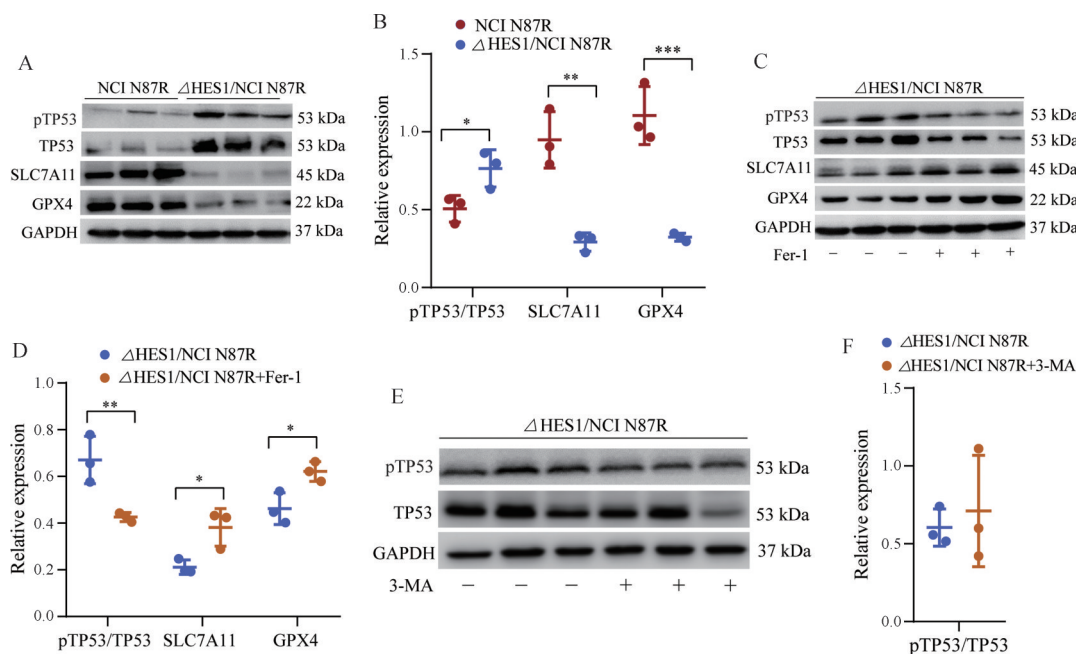


Figure 8 Expression of some proteins detected by Western blot. A, B: The expression of TP53, pTP53, SLC7A11 and GPX4 in NCI N87R and Δ HES1/NCI N87R cells by Western blot; C, D: The expression of TP53, pTP53, SLC7A11 and GPX4 in Δ HES1/NCI N87R cells after Fer-1 treatment; E, F: The expression of TP53 and pTP53 in Δ HES1/NCI N87R cells after 3-MA treatment. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. TP53: Tumor antigen p53; pTP53: Phosphorylation tumor antigen p53; SLC7A11: Solute carrier family 7 member 11; GPX4: Glutathione peroxidase 4

噬、谷胱甘肽代谢等多条通路改变。反之,抑制铁死亡能够增强 Δ HES1/NCI N87R细胞对赫赛汀抗药性,提示HES1介导的铁死亡可能是逆转胃癌赫赛汀耐药的潜在策略。

众所周知,TP53介导的细胞信号转导在调节细胞代谢过程中发挥复杂且重要的调控作用。TP53通过转录依赖方式抑制system Xc-亚基SLC7A11的表达,造成胞内胱氨酸摄取减少,谷胱甘肽合成被抑制,导致GPX4活性降低,引发细胞铁死亡^[21,22]。研究数据显示,与NCI N87R相比, Δ HES1/NCI N87R细胞pTP53/TP53的比值升高,而SLC7A11和GPX4的水平降低。使用抑制剂Fer-1抑制 Δ HES1/NCI N87R细胞铁死亡,则能够逆转SLC7A11和GPX4的表达,且pTP53/TP53的比值降低,且一定程度上促进 Δ HES1/NCI N87R细胞对赫赛汀的抗药性,提示HES1介导的TP53/SLC7A11/GPX4信号轴在胃癌赫赛汀耐药过程中具有重要调控作用(图9)。另一方面,在细胞铁代谢中, Fe^{3+} 经转铁蛋白TFR1转运至胞内,再经金属还原酶STEAP3 (metalloreductase STEAP3, STEAP3) 转化为 Fe^{2+} ,并通过双性和mab-3相关转录因子1 (doublesex and mab-3-related transcription factor 1, DMT1) 释放到胞质中,形成铁复合物,多余的 Fe^{2+} 在胞内形成不稳定铁池,参与Fenton反应,产生脂质活性氧,引起铁死亡(图9)。本研究数据显示, Δ HES1/NCI N87R细胞铁浓度显著增加,提示脂质活性氧水平升高,这为细胞铁死亡发生提供了必要条件。

脂肪酸 β -氧化是细胞获取能量的主要形式, β -氧化通过减少未酯化PUFAs的有效性对铁死亡产生抑

制作用^[23]。相反,细胞中未被氧化的PUFAs可增强线粒体氧化应激水平和脂质过氧化能力,导致铁死亡发生^[23,24]。数据显示,与脂肪酸 β -氧化相关的基因,除了ACBD7和ACOT11上调之外,其余基因包括CPT1A、ECI1、ACADM、CPT2、HADHA、ACSF2、ACADVL、ECHS1、HADHB、ACAA2、ACOT9和SCP2在 Δ HES1/NCI N87R中的表达均降低,提示 Δ HES1/NCI N87R细胞脂肪酸 β -氧化能力降低,游离PUFAs水平增加,脂质过氧化水平提高,为 Δ HES1/NCI N87R细胞铁死亡创造了先决条件。

众所周知,线粒体中富含大量铁,这些铁不仅参与铁-硫(Fe-S)簇和血红素合成,而且直接参与线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mitoROS)的积累,累积的mitoROS可以直接与线粒体膜多不饱和脂肪酸反应,导致脂质过氧化水平提高,造成线粒体DNA(mtDNA)损伤,进而导致铁死亡^[25]。此外,作为氧化磷酸化的主要场所,TCA循环流动性的提高能够直接产生ROS,这为细胞启动铁死亡提供了有利条件^[26]。本研究数据显示,与TCA循环相关的分子,包括PCK2、OGDH、SDHA、PDHB、CS、SUCLA2、IDH3B、SUCLG2、PC、ACO2和MDH2在 Δ HES1/NCI N87R细胞的表达均显著增加,提示 Δ HES1/NCI N87R细胞内TCA循环流动能力增强,为活性氧的产生提供了源动力。

自噬是独立于caspase依赖的细胞程序性死亡方式,对维持细胞内稳态起关键作用^[27]。肿瘤化疗过程伴随自噬与铁死亡的交互调控作用,它们共同参与肿瘤的化疗耐药,然而二者在肿瘤耐药中的调控机制尚未完全阐明。在急性淋巴细胞白血病细胞(acute lymphocytic leukemia, ALL)中,自噬通过影响铁蛋白及不稳定铁池调节了细胞铁稳态,从而影响ALL对铁死亡激活剂的敏感性^[28];在胶质母细胞瘤中,自噬和铁死亡相互拮抗,抑制自噬诱导的铁死亡有效提高胶质母细胞瘤对替莫唑胺的敏感性^[29]。与前者不同的是,在拉帕替尼对乳腺癌的治疗中,铁死亡与自噬相互独立^[30]。也有报道,铁死亡时,铁蛋白重链FTH1和铁蛋白轻链FTL的表达均降低,且FTH1/FTL可通过自噬增加铁的水平^[31]。本研究结果显示,与自噬直接相关的分子在 Δ HES1/NCI N87R细胞中显著变化,其中mTOR、ATG12、ATG7、ECHS1、SCP2、WIPI2、SPTLC1和RB1CC1表达上调,而FTL、ATG2A、RPTOR、RHEB和COASY表达下调,进一步功能研究显示,抑制自噬一定程度可逆转胃癌赫赛汀耐药,然而自噬抑制剂3-MA对TP53磷酸化水平无显著影响,提示本研究中 Δ HES1/NCI N87R细胞的自噬作用并不直接由TP53所介导,是否由铁蛋白组件FTL/FTH1调控尚需进一

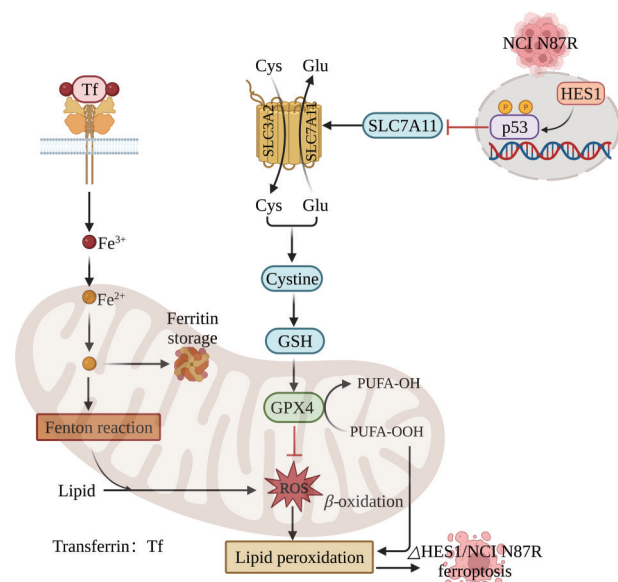


Figure 9 Mechanism of HES1 regulating herceptin resistance in gastric cancer cells by TP53/SCL7A11/GPX4 signaling

步探究。

Notch和TP53在多种肿瘤信号转导过程中具有交互作用,作为Notch下游的重要靶基因,HES1在哺乳动物细胞中可通过翻译后机制激活TP53,导致其磷酸水平改变^[32],尽管这种作用在调控细胞发育中至关重要,然而在肿瘤耐药中的作用尚未明确。结果显示,敲除HES1可激活TP53,活化的TP53通过转录抑制SLC7A11表达,继而导致GPX4活性降低,使细胞抗氧化能力降低,从而诱导细胞铁死亡(图9),提示HES1介导的TP53/SLC7A11/GPX4信号轴调控了胃癌细胞对赫赛汀的耐药。然而,HES1与TP53之间的调控机制尚不明确,其在胃癌赫赛汀耐药中的作用尚需进一步探究。

作者贡献: 刘文虎提出研究思路,完成部分实验操作、数据分析及文章撰写;张金花负责部分实验操作;常晋霞负责部分数据分析、英文修改及校对;汤建才提供技术支持。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer [J]. *Nature*, 2012, 487: 239-243.
- [2] Liu WH, Wang Y, Li SM, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of acquired herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 553-560.
- [3] Zhu Y, Zhu X, Wei X, et al. HER2-targeted therapies in gastric cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876: 188549.
- [4] Meric-Bernstam F, Johnson AM, Dumbrava EEI, et al. Advances in HER2-targeted therapy: novel agents and opportunities beyond breast and gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25: 2033-2041.
- [5] Wang J, Sun N, Ju Y, et al. miR-381-3p cooperated with HES1 to regulate the proliferation and differentiation of retinal progenitor cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 853215.
- [6] Sun L, Ke J, He Z, et al. HES1 promotes colorectal cancer cell resistance to 5-Fu by inducing of EMT and ABC transporter proteins [J]. *J Cancer*, 2017, 8: 2802-2808.
- [7] Groeneweg JW, DiGloria CM, Yuan J, et al. Inhibition of Notch signaling in combination with paclitaxel reduces platinum-resistant ovarian tumor growth [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 171.
- [8] Chang JX, Wang Y, Zhang F, et al. Proteomic study of transcription factors in trastuzumab-resistant gastric cancer based on liquid chromatography-mass spectrometry technique [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2019, 47: 1035-1044.
- [9] Liu WH, Tang JC, Chang JX. RUNX3 regulates trastuzumab resistance of gastric cancer cells: a metabolomic analysis based on UPLC-Q exactive focus orbitrap mass spectrometry [J]. *J South Med Univ (南方医科大学学报)*, 2022, 42: 498-508.
- [10] Chang JX, Wang SB, Yuan JB, et al. Label-free quantitative proteomic study of RUNX3 regulating herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1953-1964.
- [11] Liu WH, Yuan JB, Chang JX. Label-free quantitative proteomics for investigation of signaling pathways of GATA6 regulating trastuzumab resistance in gastric cancer cells [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2020, 48: 187-196.
- [12] Wi-Niewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6: 359-362.
- [13] Liu W, Yuan J, Liu Z, et al. Label-free quantitative proteomics combined with biological validation reveals activation of Wnt/ β -catenin pathway contributing to trastuzumab resistance in gastric cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1981.
- [14] Wang J, Sun Y, Zhang X, et al. Oxidative stress activates NORAD expression by H3K27ac and promotes oxaliplatin resistance in gastric cancer by enhancing autophagy flux via targeting the miR-433-3p [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 90.
- [15] Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17: 395-417.
- [16] Zhu C, Guan X, Zhang X, et al. Targeting KRAS mutant cancers: from druggable therapy to drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 159.
- [17] Liu Y, Li Q, Zhou L, et al. Cancer drug resistance: redox resetting renders a way [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 42740-42761.
- [18] Ouyang SH, Wu YP, Sun WY, et al. Research progress on the detection methods and their application in ferroptosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1544-1556.
- [19] Zhang C, Liu X, Jin S, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 47.
- [20] Yang Z, Guo L, Liu D, et al. Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 5072-5087.
- [21] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumor suppression [J]. *Nature*, 2015, 520: 57-62.
- [22] Kang R, Kroemer G, Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 162-168.
- [23] Nassar ZD, Mah CY, Dehairs J, et al. Human DECR1 is an androgen-repressed survival factor that regulates PUFA oxidation to protect prostate tumor cells from ferroptosis [J]. *Elife*, 2020, 9: e54166.
- [24] Jiang XM, Deng R, Wei Y, et al. Research progress on ferroptosis regulated by glycolysis-fatty acid metabolism in metabolic diseases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1204-1210.

- [25] Wang H, Liu C, Zhao Y, et al. Mitochondria regulation in ferroptosis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99: 151058.
- [26] Gao M, Yi J, Zhu J, et al. Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73: 354-363.
- [27] Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20: 460-473.
- [28] Zhu T, Liu B, Wu D, et al. Autophagy regulates VDAC3 ubiquitination by FBXW7 to promote erastin-induced ferroptosis in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 740884.
- [29] Buccarelli M, Marconi M, Pacioni S, et al. Inhibition of autophagy increases susceptibility of glioblastoma stem cells to temozolomide by igniting ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 841.
- [30] Ma S, Dielschneider RF, Henson ES, et al. Ferroptosis and autophagy induced cell death occur independently after siramesine and lapatinib treatment in breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0182921.
- [31] Hou W, Xie Y, Song X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. *Autophagy*, 2016, 12: 1425-1428.
- [32] Huang Q, Raya A, DeJesus P, et al. Identification of p53 regulators by genome-wide functional analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 3456-3461.