

基于蛋白质组学技术的结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药机制研究

刘文虎^{1,2}, 任丹^{1,2}, 张金花^{1,2}, 吴敏^{1,2}, 谢楠¹, 常晋霞^{3*}

(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: 奥沙利铂 (oxaliplatin, Oxa) 是进展期结直肠癌化疗常用药物, 然而多数患者在接受治疗后出现耐药, 相关耐药机制尚未完全阐明。本研究以结直肠癌细胞 HCT116 为对象, 通过药物浓度梯度诱导构建奥沙利铂耐药细胞株 (HCT116/Oxa)。在此基础上基于蛋白质组学分析 HCT116/Oxa 细胞表达谱; 采用 The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) 数据库进行基因本体 (gene ontolog, GO) 分析; 利用 GeneAnalytics 数据库通路富集分析; 通过抑制剂、免疫印迹、siRNA 技术揭示结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的潜在靶标及其机制。结果显示, HCT116/Oxa 细胞对奥沙利铂的耐药指数为 10.2。与 HCT116 相比, HCT116/Oxa 对奥沙利铂表现出强的增殖潜能和抗凋亡能力。蛋白质组数据表明, HCT116/Oxa 细胞 717 种基因表达改变, 上调 399 种, 下调 318 种。GO 分析显示, 差异表达基因与氧化压力反应、铁代谢、脂质代谢、凋亡、细胞周期进展等生物学过程有关。通路富集显示, 细胞代谢、铁死亡、Nrf2-ARE 信号、脂肪酸及谷胱甘肽代谢等通路显著变化。定量结果显示, 与铁死亡相关分子, 包括谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶调节亚基 (glutamate-cysteine ligase regulatory subunit, GCLM)、铁蛋白轻链 (ferritin light chain, FTL)、铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH1)、血红素氧合酶 1 (heme oxygenase 1, HMOX1)、谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GSR) 和 NADH 脱氢酶 1 (NADH dehydrogenase 1, NQO1) 的表达显著增加, 而长链脂肪酸-辅酶 A 连接酶 (long chain fatty acid-CoA ligase, ACSL) 4 和 ACSL1 的表达降低。功能研究表明, GPX4 特异性抑制剂 RSL3 降低耐药细胞活力, 提高脂质过氧化水平, 增加亚铁离子和丙二醛含量, 降低谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 浓度。免疫印迹显示, HCT116/Oxa 细胞中 GPX4、FTH1、FTL、GSR 表达增加, ACSL4 降低。RSL3 能够逆转 GPX4、FTH1、FTL、GSR 和 ACSL4 的水平。进一步发现, 敲低 GPX4 可降低耐药细胞活力, 提高脂质过氧化水平和降低 GSH 浓度, 表明 GSH/GPX4 通路介导的铁死亡抵抗是 HCT116/Oxa 对奥沙利铂耐药的潜在机制, 抑制 GSH/GPX4 通路是逆转结直肠癌对奥沙利铂耐药的途径。

关键词: 结直肠癌; 奥沙利铂耐药; 蛋白质组学; 铁死亡; GSH/GPX4 信号通路

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1432-11

Mechanism of oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells base on proteomics

LIU Wen-hu^{1,2}, REN Dan^{1,2}, ZHANG Jin-hua^{1,2}, WU Min^{1,2}, XIE Nan¹, CHANG Jin-xia^{3*}

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

Abstract: Oxaliplatin (Oxa) is a chemotherapy drug commonly used for advanced colorectal cancer, however most patients develop resistance after treatment while the mechanisms of which have not been fully elucidated. In

收稿日期: 2024-12-15; 修回日期: 2025-02-12.

基金项目: 四川省应用基础科研项目 (2019YJ0378); 大学生创新创业训练计划项目 (202310634010); 南充市市校合作项目 (19SXHZ0298); 川北医学院重点发展项目 (CBY22-ZDA01); 川北医学院转化医学研究中心开放型课题 (ZHXYX2023002).

*通讯作者 E-mail: jinxiachang@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1248

this study, oxaliplatin resistant cell lines were constructed from human colorectal cancer HCT116 cells through concentration gradient induction. On this basis, we investigated the expression profiling of HCT116/Oxa cells based on quantitative proteomics. Gene ontology (GO) analysis was conducted *via* The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery Database (DAVID), and pathway enrichment analysis was done using GeneAnalytics database. The potential targets and molecular mechanisms of oxaliplatin resistance in colorectal cancer were further studied by inhibitors, Western blot and siRNA. The results showed that the oxaliplatin resistance index of HCT116/Oxa cells was 10.2. HCT116/Oxa cells demonstrated stronger proliferation potential and anti-apoptotic capacity to oxaliplatin compared with HCT116 cells. Proteomic data demonstrated significant expression change of 717 genes in HCT116/Oxa cells, among which 399 genes were up-regulated while 318 ones down-regulated comparing with HCT116 cells. GO enrichment analysis showed that differentially expressed genes were mainly related to biological processes such as oxidative stress response, iron metabolism, lipid metabolism, apoptosis and cell cycle progression. Pathway analysis displayed notable changes of cell metabolism, ferroptosis, Nrf2-ARE signaling, fatty acid and glutathione metabolism in HCT116/Oxa cells. Quantitative results indicated that the expression of proteins directly related to ferroptosis, including glutathione peroxidase 4 (GPX4), glutamate-cysteine ligase regulatory subunit (GCLM), ferritin light chain (FTL), ferritin heavy chain (FTH1), heme oxygenase 1 (HMOX1), glutathione reductase (GSR) and NADH dehydrogenase 1 (NQO1) increased, while long chain fatty acid-CoA ligase (ACSL) 4 and ACSL1 decreased significantly in HCT116/Oxa cells. Functional studies showed that RSL3, a specific inhibitor of GPX4, decreased the viability of drug-resistant cells, improved lipid peroxidation, increased the concentration of ferrous ions, malondialdehyde, and decreased the concentration of glutathione (GSH). Western blot showed that the expressions of GPX4, FTH1, FTL and GSR increased in HCT116/Oxa, while ACSL4 decreased. RSL3 reversed the levels of GPX4, FTH1, FTL, GSR and ACSL4. It was further found that knockdown of GPX4 decreased the viability of drug-resistant cells, increased lipid peroxidation levels and decreased GSH concentration. These results suggest that ferroptosis resistance mediated by GSH/GPX4 pathway may be a potential mechanism of oxaliplatin resistance in HCT116/Oxa, and inhibition of GSH/GPX4 signaling could be an effective approach to reverse oxaliplatin resistance in colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; oxaliplatin resistance; proteomics; ferroptosis; GSH/GPX4 signaling pathway

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 具有发病率和死亡率高、侵略性强、转移快及预后差等特点, 已严重威胁人类健康^[1]。奥沙利铂 (oxaliplatin, Oxa) 是第三代铂类抗肿瘤药物, 通过与 DNA 双链共价结合形成链间交联, 阻断 DNA 的复制和转录, 发挥抗肿瘤作用。临床上, 以奥沙利铂为基础的联合治疗为结直肠癌患者带来了生存受益。然而在接受化疗的患者中, 有超过 50% 在 II 期和 III 期治疗阶段对奥沙利铂产生耐药, 进一步增加了治疗难度^[2,3]。因此, 研究结直肠癌对奥沙利铂耐药的机制, 阐明逆转耐药策略, 对提高化疗效果及改善预后具有现实意义。

铁死亡 (ferroptosis) 是一种依赖于铁且不同于凋亡、自噬和坏死的新型程序性细胞死亡方式, 本质是谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的耗竭或谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的失活, 导致脂质过氧化物不能通过 GPX4 催化的谷胱甘肽还原酶代谢, 导致细胞膜氧化损伤^[4]。研究表明, 铁死亡不仅在抑制肿瘤增殖及转移方面发挥关键作用, 而且在诱导肿瘤耐药过程中具有重要作用^[5,6]。因此, 靶向铁死亡

不仅可以协同发挥抗肿瘤作用, 而且为逆转肿瘤耐药提供了可能。如 Linc01134 通过促进核因子相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 招募和 GPX4 的转录, 诱导铁死亡抵抗, 降低肝癌细胞对奥沙利铂的化疗抵抗^[7]; 源于外泌体的 DACT3-AS1 通过 miR-181a-5p/SIRT1 诱导铁死亡提高了胃癌细胞对奥沙利铂化疗敏感性^[8]。

尽管这些研究从不同视角揭示了结直肠癌化疗抵抗的机制, 然而肿瘤耐药的复杂性、异质性和可控性导致对结直肠癌奥沙利铂耐药机制的认识和理解还不够全面。近年来, 基于蛋白质组学的研究策略已成为揭示肿瘤耐药机制的重要手段之一, 通过分析肿瘤耐药后的蛋白质组特征, 将为肿瘤耐药的系统性、特征性研究提供新的视角, 也为逆转耐药策略提供更多可能。本研究以结直肠癌细胞 HCT116 为对象, 采用奥沙利铂加压诱导构建结直肠癌奥沙利铂耐药细胞株 HCT116/Oxa, 基于定量蛋白质组学和生信分析揭示 HCT116/Oxa 细胞蛋白质表达谱及信号通路的改变, 在此基础上, 结合功能实验阐明结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的潜在机制。本研究将为逆转结直肠癌对奥沙

利铂耐药治疗提供实验依据。

材料与方法

主要仪器 Orbitrap Fusion Lumos质谱仪、Easy-nLC 2000 nano 纳升高效液相色谱系统和细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 2695HPLC 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 凝胶成像系统、电泳仪和多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 全光谱流式细胞分析仪 (日本 SONY 公司); 离心浓缩仪 (德国 Eppendorf 公司)。

细胞与试剂 结直肠癌细胞 HCT116 购于中国科学院上海细胞库, 奥沙利铂耐药株 HCT116/Oxa 为自建细胞系。奥沙利铂 (HY-17371) 和 RSL3 (HY-103087) 购于美国 MedChemExpress 公司; 胰蛋白酶 (XBA06-1) 和 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培养液 (XB01) 购于环凯生物; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, BS1101) 购于奥普赛; cell counting kit-8 (CCK-8, KQ749) 购于同仁化学研究所; GSH (S0052)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA, S0131S) 试剂盒购于 Beyotime 公司; 蛋白定量试剂盒 (MA0082) 购于美伦生物; GPX4 (67763-1-Ig)、ferritin light chain (FTL, 10727-1-AP)、ferritin heavy chain (FTH1, 11682-1-AP)、long chain fatty acid-CoA ligase (ACSL) 4 (22401-1-AP)、glutathione reductase (GSR, 15712-1-AP) 及 GAPDH (10494-1-AP) 抗体购于 Proteintech 公司; HRP 偶联的二抗 (AS014) 购于 Abclonal 公司; C11-BODIPY 581/591 试剂盒购于美国 Thermo Fisher 公司; Lipofectamine 3000 购于美国 Invitrogen 公司; siCtrl 和 siGPX4 序列由锐博生物合成。

结直肠癌奥沙利铂耐药细胞株的构建 对数期 HCT116 细胞按照每毫升 5×10^5 个接种于培养皿中, 细胞融合度达 70% 时, 更换含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 奥沙利铂的培养液, 待细胞在该浓度下能够稳定生长后增加奥沙利铂浓度至 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按此法梯度诱导直至奥沙利铂浓度达 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 奥沙利铂的梯度浓度为 0.5、1、2、4、8、16、32 和 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 能够在 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 奥沙利铂培养液中生长的细胞命名为奥沙利铂耐药株 HCT116/Oxa, 为维持其耐药属性, HCT116/Oxa 培养液中需加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 奥沙利铂。

耐药指数检测 对数期 HCT116 和 HCT116/Oxa 细胞分别接种于 96 孔板, 每孔含细胞数 5×10^3 个。培养过夜后, 更换为含奥沙利铂 (0.5 、 1 、 2 、 4 、 8 、 16 、 32 和 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的新鲜培养液, 同时设空白组, 培养 48 h, 每孔加入含 10% CCK-8 的新型培养液, 孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度 (A) 值。计算半抑制浓度 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}), 耐药指数

(resistance index, RI) = 耐药细胞株 IC_{50} /敏感细胞株 IC_{50} 。

细胞凋亡检测 对数期细胞 HCT116 和 HCT116/Oxa 分别以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养过夜, 更换含奥沙利铂分别为 0、2、 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的新鲜培养液培养, 48 h 后加入 200 μL 不含 EDTA 的胰酶消化, PBS 洗两次。将 5×10^5 个细胞用 binding buffer 悬浮后加入 5 μL Annexin V-FITC, 混匀, 加入 5 μL 碘化吡啶, 避光室温反应 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

平板克隆形成实验 对数期细胞按照 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板中, 每孔加 2 mL 培养基, 过夜培养, 更换培养液培养 14 天, 待皿中出现肉眼可见细胞集落, PBS 清洗两次, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗两次, 加入 1 mL 0.1% 结晶紫染色液染色 15 min, 洗去染色液, 计数拍照。

划痕修复实验 对数期细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达 80% 时, 按照文献^[9]划痕修复实验, 记录 0、24 和 48 h 的划痕区域, 计算划痕修复率。

细胞活力检测 对数期细胞接种于 96 孔板, 每孔细胞数为 5×10^3 个。设 HCT116/Oxa、HCT116/Oxa+RSL3_L 和 HCT116/Oxa+RSL3_H 组 (RSL3_L 和 RSL3_H 分别表示 RSL3 浓度为 5 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), RSL3 处理 24 h 后更换培养液继续培养 48 h, 每孔加入含 10% CCK-8 培养液孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处 A 值, 计算相对细胞活力。

脂质过氧化检测 对数期细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 设 HCT116/Oxa、HCT116/Oxa+RSL3_L 和 HCT116/Oxa+RSL3_H 组, RSL3 处理 24 h 后 PBS 洗 2 次, 加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ C11-BODIPY 581/591 染液, 孵育 30 min, PBS 洗 2 次, 加入 500 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞分析。

MDA 检测 对数期细胞以 1×10^6 个/孔接种于培养皿中, 设 HCT116/Oxa、HCT116+RSL3_L 和 HCT116/Oxa+RSL3_H 组, RSL3 处理 24 h。收集细胞, 计数, 加入 1 mL MDA 提取液, 超声、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $8\ 000 \times g$ 离心 10 min, 收集上清, 加入 MDA 工作液 300 μL , $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 60 min, 冷至室温, $10\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清 200 μL 于 96 孔板中, 酶标仪测定 532 和 600 nm 处 A 值, 计算 MDA 含量。

亚铁离子检测 对数期细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 设 HCT116/Oxa、HCT116+RSL3_L 和 HCT116/Oxa+RSL3_H 组, RSL3 处理 24 h。按试剂盒说明加入试剂一, 超声裂解, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清 200 μL , 加入试剂二 100 μL , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育

10 min, 加入氯仿 100 μL , 涡旋、12 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 酶标仪检测 593 nm 处 A 值, 计算亚铁离子浓度。

GSH 检测 对数期细胞以 2×10^5 个/孔种植于培养皿中, 设 HCT116/Oxa、HCT116+RSL3_L 和 HCT116/Oxa+RSL3_H 组, RSL3 处理 24 h。收集细胞沉淀, 加入沉淀 3 倍体积的蛋白去除试剂溶液, 涡旋, 液氮速冻, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 上清加入 GSH 试剂、混匀, 反应 25 min, 测定 412 nm 处 A 值, 计算 GSH 含量。

透射电镜 对数期 HCT116/Oxa 细胞, 用 2.5% 戊二醛固定过夜。按文献^[10]方法进行透射电镜。

RNA 干扰实验 对数期 HCT116/Oxa 按 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 细胞融合度达 70% 时, 按转染要求将 GPX4 的干扰质粒和对照质粒分别通过 Lipofectamine 3000 转染到 HCT116/Oxa 细胞中, siRNAs 序列如下: siGPX4#1: 5'-GCTACAACGTCAAATTCGA-3'; siGPX4#2: 5'-GTAACGAAGAGATCAAAGA-3'; siGPX4#3: 5'-GAGGCAAGACCGAAGTAAA-3'; siCtrl: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。转染 48 h 后, 收集细胞, 免疫印迹检测转染质粒的干扰效果。选择转染率高的质粒对应的细胞株, 用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥沙利铂处理 48 h, 检测细胞活力、MDA 和 GSH 的变化。

免疫印迹实验 对数期细胞设为 HCT116、HCT116/Oxa、HCT116/Oxa+RSL3_L 及 HCT116/Oxa+RSL3_H 组, RSL3 处理 24 h。按文献^[11,12]进行免疫印迹实验。一抗稀释 1 000 倍, 二抗稀释 3 000 倍, ImageJ 计算灰度值, 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 $\text{cm} \times 100 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$) 和 C18 分析柱 (15 $\text{cm} \times 75 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。流动相 A 为 0.1% 甲酸, 流动相 B 为 0.1% 甲酸-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 $\text{nL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

质谱检测 Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪, 电喷雾离子源, 电压为 2.2 kV, 离子传输毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 数据采集使用数据依赖模式 (data-dependent acquisition mode, DDA), 一级 Orbitrap 的扫描质荷比 (m/z) 为 350~1 550, 分辨率为 120 000, 自动增益控制 (automatic gain control, AGC) 为 5×10^5 , 离子最大注入时间 50 ms; 二级质谱采用 32% 的高能碰撞解离, 碎片离子被进一步检测, 分辨率 15 000, AGC targets 为 5×10^4 ions, 最大注入时间 22 ms; 母离子选择窗口 1.6 Th, 电荷数 2~7 的离子进行 MS/MS 采集, 动态排除时间为 30 s, 重复次数为 1。

蛋白质提取、还原烷基化及 FASP 酶切 对数期 HCT116 和 HCT116/Oxa 细胞用 PBS 洗 2 次, 按照每 100 μL 细胞沉淀加入 600 μL 2 \times DOC 裂解缓冲液, 震荡后冰上裂解 10 min, 超声 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 取上清, 测定蛋白浓度。还原烷基化及过滤辅助样品制备参照文献^[13]。

肽段分离 肽段用 Waters 2695 HPLC 液相系统分离, 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 洗脱梯度如下: 0~34 min, 0~98% B; 35~40 min, 98% B, 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集洗脱液, 按顺序合并洗脱液为 8 个组分, 合并组分为 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。

蛋白质质量及差异表达基因分析 肽段经 0.1% 甲酸复溶, 12 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min, 上清经 Easy-nLC 2000 注入 Orbitrap Fusion Lumos, 采用 Proteome Discover (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 软件搜库, 一级和二级质谱精度分别为 20 ppm 和 0.05 Da, 酶解最大允许漏切数目为 2。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, 基于 Percolator 算法的肽段错误发现率 (false discovery rate, FDR) 小于 1%。

所有蛋白丰度按照总面积做归一化分析, 方法为蛋白峰面积除以全部蛋白峰面积之和, 再将所有相对峰面积扩大 10^5 倍。每个蛋白被检测到的特异性肽段数 ≥ 2 , 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 , 且满足 $P < 0.05$, 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 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示。采用 SPSS 26.0 进行统计学分析, 组间均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。定量作图采用 GraphPad Prism 8.0.1, 生物信息学采用 RStudio (version 3.6.2)。

结果

1 奥沙利铂耐药结直肠癌细胞株的构建及评价

基于 Genomics of Drug Sensitivity in Cancer 数据库筛选对奥沙利铂敏感的结直肠癌细胞系, 显示 46 种细胞中有 12 种对奥沙利铂敏感 ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 其中奥沙利铂对 HCT116 的 IC_{50} 为 $4.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 1A)。通过浓度梯度加压构建结直肠癌奥沙利铂耐药株 HCT116/Oxa, 可见 HCT116/Oxa 细胞形态变圆、触角消失且呈散状生长 (图 1B)。CCK-8 结果表明, 奥沙利

铂对 HCT116/Oxa 的 IC_{50} 为 $12.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对 HCT116 的 IC_{50} 为 $1.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 可知 HCT116/Oxa 对奥沙利铂的耐药指数为 10.2 (图 1C)。流式细胞术显示, HCT116 细胞分别在 0、2 和 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 奥沙利铂作用 24 h 后, 其凋亡率显著增加, HCT116/Oxa 的凋亡率无显著变化 (图 1D、E), 表明奥沙利铂耐药结直肠癌细胞株构建成功。

2 HCT116/Oxa 细胞增殖及迁移能力增强

平板克隆结果显示, HCT116/Oxa 细胞的克隆数为对照组的 1.4 倍 (图 2A、B), 提示 HCT116/Oxa 细胞群体依赖性和增殖潜能提高。划痕修复实验表明, 24 和 48 h 时, HCT116/Oxa 的划痕修复速度较 HCT116 更快, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 72 h 时, HCT116/Oxa 的划痕修复率已达 100%, 而 HCT116 的修复率为 74.2% ($P < 0.05$), 表明 HCT116 细胞获得耐药后其迁移能力增强 (图 2C、D)。

3 HCT116/Oxa 细胞蛋白表达谱及差异表达蛋白筛选

在肽段 FDR $< 1\%$ 条件下, 鉴定到基因数为 6 097 个, 将 3 个及以上样本中被检测到的基因纳入分析。

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 显示, HCT116 和 HCT116/Oxa 组分别沿主成分 1 (principal component 1, PC1) 和主成分 2 (principal component 2, PC2) 两个维度分组, PC1 与 PC2 之和可解释组间 88.47% 的变异, 组内聚集良好, 组间区分明显 (图 3A)。使用火山图筛选差异表达基因, HCT116/Oxa 中上调基因在火山图中标注为红色 ($FC \geq 1.5, P < 0.05$), 下调基因标注为蓝色 ($FC \leq 0.67, P < 0.05$), 其余基因视为表达无显著差异, 标注为灰色。结果显示, HCT116/Oxa 中有 717 种基因表达改变, 其中上调 399 种, 下调 318 种 (图 3B)。热图趋势变化显示, HCT116/Oxa 中超过半数基因的表达上调, 其变化趋势归属 2 个聚类 (图 3C)。对差异表达基因按倍数变化排序, 显示倍数增加 TOP5 的基因分别是 *IQGAP2*、*ENO3*、*NES*、*GCSH* 和 *RCOR3*, 倍数减少 TOP5 的基因分别是 *ACSL4*、*FER*、*CHDH*、*ABCC2* 和 *CKMT1B*。值得注意的是, 与 HCT116 相比, 铁死亡基因 *GPX4*、*FTL*、*FTH1*、*GSR*、*GCLM*、*HMOX1*、*NQO1*、*SRXN1*、*SQSTM1* 在 HCT116/Oxa 中显著增加, 而 *ACSL1* 和 *ACSL4* 显著降低 (图 3D),

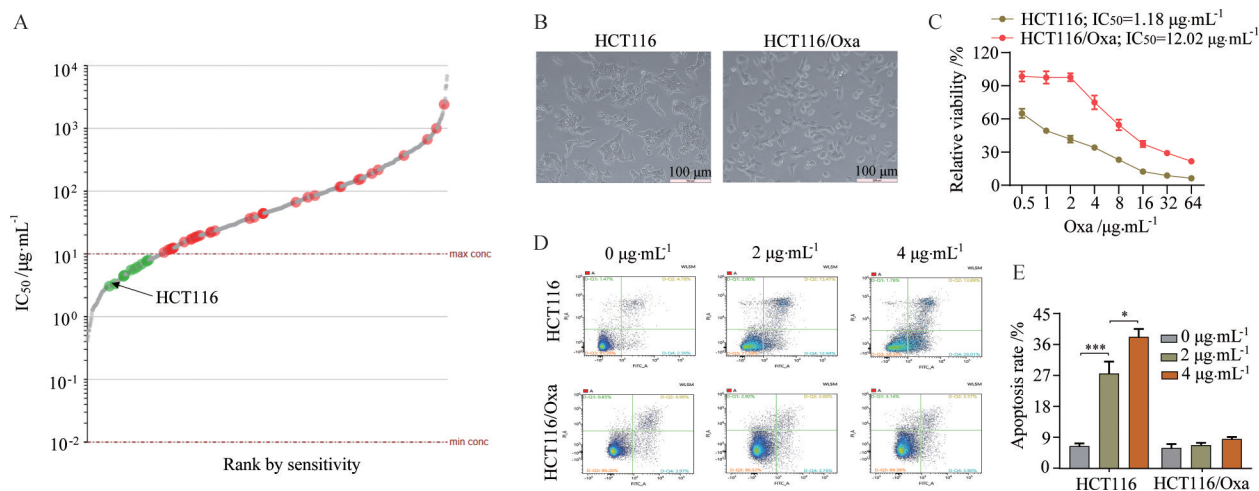


Figure 1 Establishment and evaluation of HCT116/Oxa cell line. A: Screening of colorectal cancer cell lines by Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Database; B: The morphological comparison between HCT116 and HCT116/Oxa cell lines (scale bar = 100 μm); C: Cell viability was detected using CCK-8 and IC_{50} values were calculated respectively; D, E: Apoptotic cells were examined by Annexin V-FITC/PI double staining kit. Representative images (left) and quantification values (right) were presented. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Oxa: Oxaliplatin; CCK-8: Cell counting kit-8; IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration

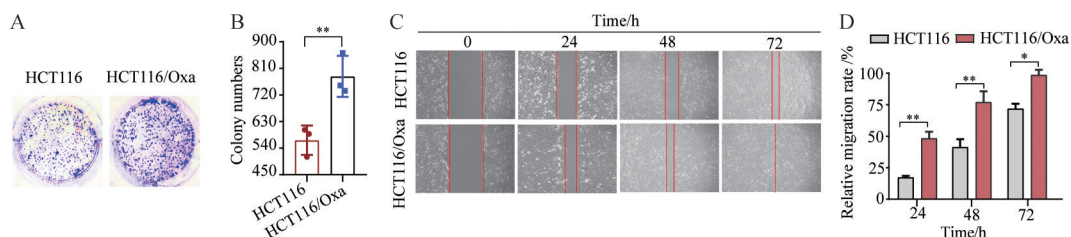


Figure 2 Detection of the proliferation and migration ability of HCT116/Oxa cells. A, B: The colony formation assays were performed and colony numbers were analyzed; C, D: The migration ability of HCT116/Oxa and HCT116 cells was analyzed using wound-healing assay and migration rate were presented. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表明HCT116/Oxa细胞蛋白表达谱改变,且铁死亡可能在诱导HCT116对奥沙利铂耐药过程中发挥了关键作用。

4 差异表达基因功能注释分析

采用DAVID数据库对差异表达基因进行基因本体学分析,对富集得分高的基因集功能注释,并按关联性和相似性构建网络。结果显示,HCT116/Oxa中上调基因主要与氧化压力反应、细胞死亡调节、铁离子平衡、脂肪酸代谢、凋亡信号调控及细胞周期反应有关(图4A),下调基因功能涉及有机酸代谢、脂质代谢、线粒体氧化磷酸化、线粒体呼吸链转运及ATP代谢(图4B)。

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,富集的前10条通路如图5A所示,其中代谢($P = 1.4 \times 10^{-7}$,GR = 0.77)、铁死亡($P = 7.7 \times 10^{-4}$,GR = 0.60)、Nrf2-ARE通路($P = 2.0 \times 10^{-3}$,GR = 0.55)显示高的富集率及显著性水平;脂肪酸降解($P = 2.7 \times 10^{-3}$,

GR = 0.54)、脂肪酸代谢($P = 3.6 \times 10^{-3}$,GR = 0.52)、脂肪酸合成($P = 6.2 \times 10^{-3}$,GR = 0.51)、谷胱甘肽代谢($P = 9.5 \times 10^{-3}$,GR = 0.48)、PPAR通路($P = 6.2 \times 10^{-3}$,GR = 0.45)、花生四烯酸代谢($P = 7.0 \times 10^{-3}$,GR = 0.44)及激素合成($P = 9.5 \times 10^{-3}$,GR = 0.42)通路变化明显。定量分析显示,HCT116/Oxa细胞中铁死亡基因*GPX4*、*GCLM*、*FTL*、*EP300*、*GSK3B*、*FTH1*、*HMOX1*、*NQO1*、*GSR*、*SQSTM1*及*SRXN1*表达上调,而*ACSL4*和*ACSL1*表达下调(图5B)。鉴于铁死亡在HCT116/Oxa中具有高的富集率及显著性变化,进一步基于STRING数据库对这些分子做网络构建,网络分子的互作最低得分 ≥ 0.7 、聚类形式为无聚类。结果显示,*GPX4*为网络的枢纽分子,与其他分子具有较高的互作得分及紧密的调控关系,提示由*GPX4*介导的铁死亡可能在促进结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药过程中发挥了重要作用(图5C)。

6 GSH/GPX4通路介导的铁死亡诱导了结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药

为进一步验证GSH/GPX4介导的铁死亡在结直肠癌奥沙利铂耐药中的作用,采用5和10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GPX4

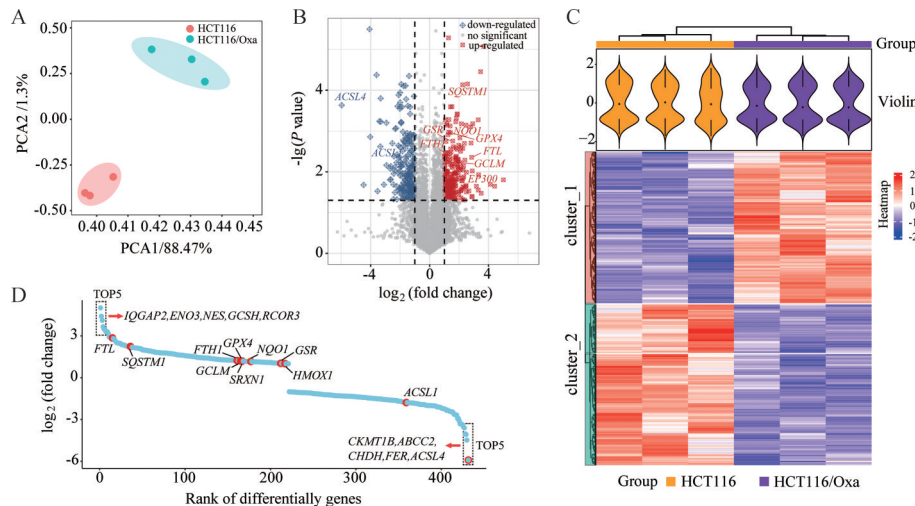


Figure 3 Proteomics profiling of HCT116 and HCT116/Oxa cell lines. A: Principal component analysis (PCA) of HCT116 and HCT116/Oxa cells; B: Identification and analysis of differentially expressed proteins by volcano plot; C: Analysis of heat map and cluster of differentially expressed proteins; D: Rank plot of differentially expressed proteins, proteins associated with ferroptosis are shown in red

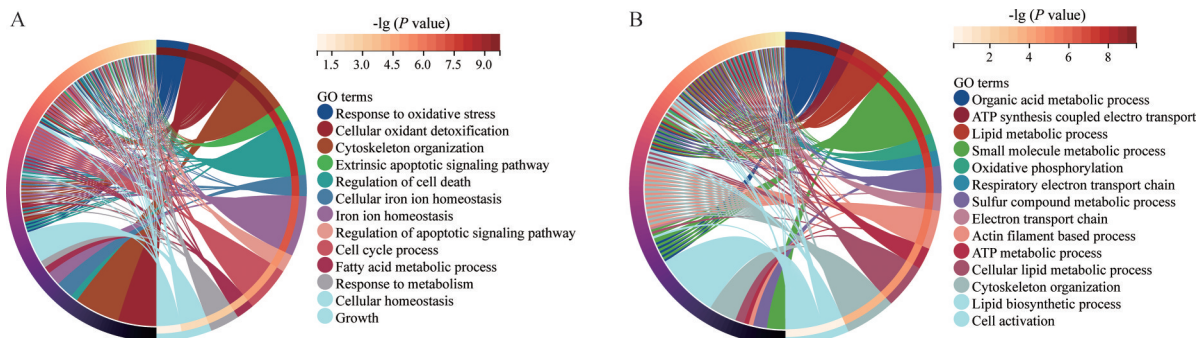


Figure 4 Gene ontology enrichment analysis of up-regulated (A) and down-regulated (B) genes in HCT116/Oxa cells

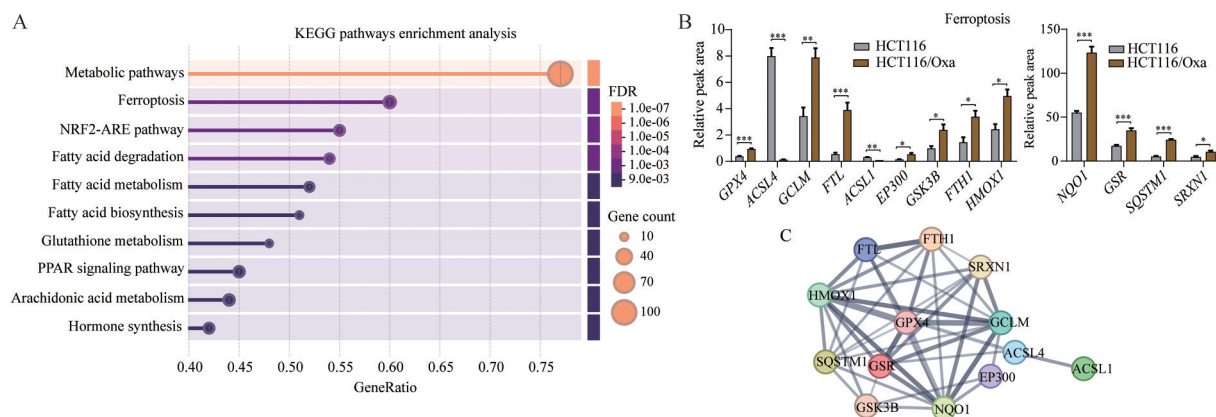


Figure 5 Enrichment and quantitative analysis of differentially expressed protein signaling pathways. A: Bubble plot visualization of signaling pathways; B: Quantitative analysis of gene expression in activated signaling pathways; C: Protein-protein interaction network plot of ferroptosis-related proteins in HCT116/Oxa cells. Line thickness of molecules indicates the strength of data support. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

特异性抑制剂 RSL3 预处理 HCT116/Oxa 细胞 24 h, 再用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 奥沙利铂作用细胞 48 h, 采用 Western blot 检测各组中 GSH/GPX4 通路相关分子的表达变化。显示 HCT116/Oxa 组中 GPX4 和 GSR 表达上调, ACSL4 表达下调 (图 6A、B), 表明 GSH/GPX4 通路被激活。使用 RSL3 预处理后, 再用奥沙利铂处理 HCT116/Oxa 细胞, 显示 GPX4、ACSL4 和 GSR 的水平被 RSL3 逆转 (图 6A、B)。进一步检测了铁蛋白组分 FTH1 和 FTL 的表达, 其变化趋势与 GPX4 和 GSR 一致, 说明 GSH/GPX4 信号介导的铁死亡抵抗可能是结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的潜在机制。

7 抑制 GSH/GPX4 逆转了 HCT116/Oxa 细胞对奥沙利铂的抗药性

为明确 GSH/GPX4 通路介导的铁死亡抵抗在 HCT116/Oxa 细胞中的作用, 采用 GPX4 特异性抑制剂 RSL3 处理 HCT116/Oxa 细胞 24 h, 再用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 奥沙利铂作用细胞 48 h, 检测铁死亡关键指标的变化。

结果显示, 5 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RSL3 预处理使奥沙利铂对 HCT116/Oxa 细胞活力抑制显著增加 (图 7A), 且 5 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RSL3 使 HCT116/Oxa 细胞的脂质过氧化水平分别增加了 2.24 和 2.56 倍 (图 7B、C)。同样, RSL3 使 MDA 及亚铁离子浓度显著增加, 而 GSH 降低 (图 7D~F)。透射电镜发现, RSL3 使 HCT116/Oxa 细胞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, 且高浓度组细胞形态明显减小, 这些现象与铁死亡形态特征相吻合 (图 7G~I)。综上, 抑制 GSH/GPX4 通路诱导铁死亡是逆转结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的潜在机制。

8 GPX4 是逆转结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的潜在治疗靶标

进一步采用 siRNA 干扰 HCT116/Oxa 细胞 GPX4, 结果显示, 靶向 GPX4 的 3 个 siRNA 序列均能够抑制 GPX4 的表达, 其中 siRNA#2 和 siRNA#3 较 siRNA#1 干扰效果更好 (图 8A、B)。因此, 以质粒 siRNA#2 和

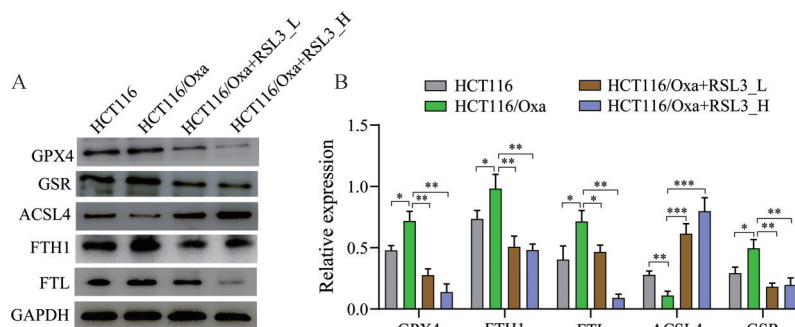


Figure 6 The detection of ferroptosis-related proteins expression by Western blot. A, B: The detection and qualification of GPX4, FTH1, FTL, ACSL4 and GSR levels in HCT116, HCT116/Oxa, HCT116/Oxa+RSL3_L and HCT116/Oxa+RSL3_H cells by Western blot, respectively. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GPX4: Glutathione peroxidase 4; FTL: Ferritin light chain; FTH1: Ferritin heavy chain; ACSL: Long chain fatty acid-CoA ligase; GSR: Glutathione reductase

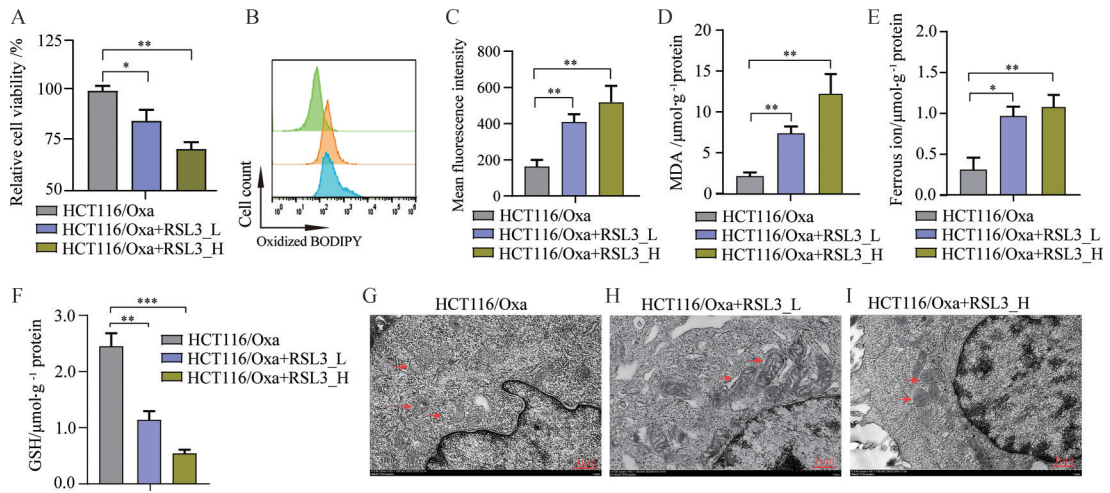


Figure 7 GPX4 inhibitor reversed oxaliplatin resistance in HCT116/Oxa cells. A: Cells were pre-treated with RSL3 for 24 h and then cultured with oxaliplatin for 48 h, cell viability was detected using CCK-8; B, C: Lipid peroxidation levels were detected by using C11-BODIPY581/591 probe; D-F: The MDA, ferrous iron and GSH levels were detected respectively; G-I: Mitochondrial morphology were photographed using transmission electron microscope. Red arrow represented mitochondrial morphology, scale bar = 1 μm . $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. MDA: Malondialdehyde; GSH: Glutathione

siRNA#3 构建的细胞为实验对象。CCK-8 结果显示, HCT116/Oxa_siGPX4 细胞活力较对照组降低, 说明其对奥沙利铂的敏感性增加 (图 8C)。同样, 干扰 GPX4 后 HCT116/Oxa 细胞的脂质过氧化及 MDA 水平增加, 而 GSH 降低 (图 8D~G), 表明 HCT116/Oxa_siGPX4 细胞对奥沙利铂敏感性增加与铁死亡有关。采用 RSL3 处理细胞 24 h, 检测其对细胞活力的影响, 显示 RSL3 显著增加奥沙利铂对 HCT116/Oxa_siCtrl 的抑制

作用, 而对 HCT116/Oxa_siGPX4#3 细胞活力的抑制更显著。然而, 采用 5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ RSL3 分别处理后, 奥沙利铂对 HCT116/Oxa_siGPX4#3 细胞活力的抑制作用无显著影响, 提示敲低 GPX4 的 HCT116/Oxa 细胞再用 RSL3 处理弱化了奥沙利铂对细胞活力的抑制作用 (图 8H)。综上, 抑制 GPX4 可增强奥沙利铂对耐药细胞化疗敏感性, GPX4 可能是结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药的治疗靶标。

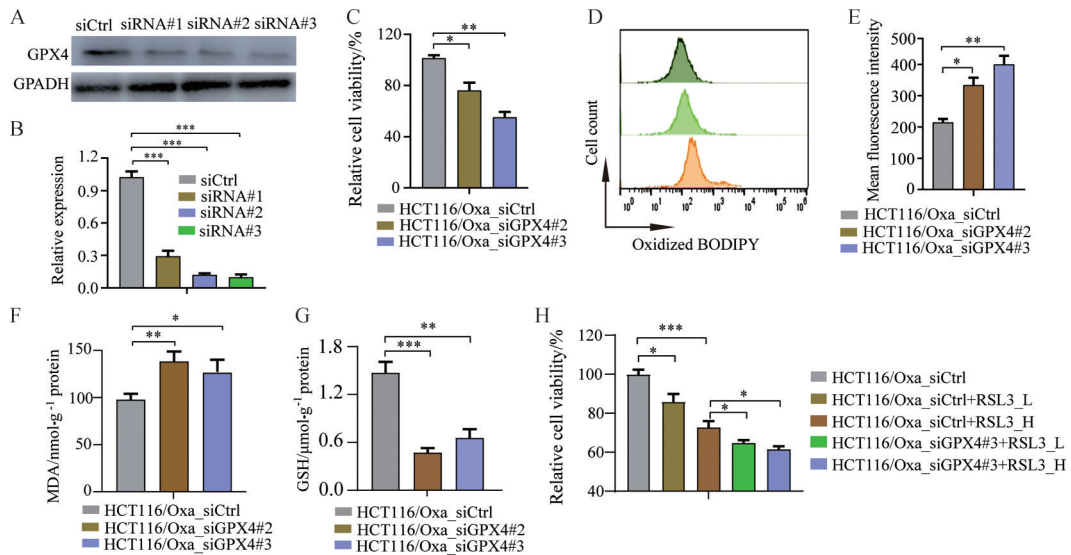


Figure 8 Knockdown of GPX4 reversed oxaliplatin resistance in colorectal cancer cell. A, B: Efficiency of GPX4 knockdown was detected by Western blot. siRNA#1, #2, #3 stands for the levels of GPX4 in HCT116/Oxa cells transfected with these three interference sequences, respectively; C: siCtrl and siGPX4 cells were treated with oxaliplatin for 48 h, respectively, cell viability was evaluated by CCK-8; D-G: siCtrl and siGPX4 cells were treated with oxaliplatin for 48 h, the level of lipid ROS, MDA and GSH was quantified, respectively; H: Cells were pre-treated with RSL3 for 24 h and then cultured with oxaliplatin for 48 h, cell viability was detected using CCK-8. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ROS: Reactive oxygen species

9 结直肠癌组织 GPX4 高表达且与患者生存呈负相关

为了明确结直肠癌组织 GPX4 表达变化的临床意义,通过基因表达谱交互分析 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA) 数据库分析了结直肠癌患者组织 GPX4 表达与患者生存率的关系。结果显示,癌组织中 GPX4 的表达高于正常组织 (图 9A),且 GPX4 高表达患者生存率较低表达患者生存率显著降低 ($P = 0.041$, 图 9B)。通过分析癌症治疗反应基因特征数据库 (Cancer Treatment Response gene signature DataBase, CTR-DataBase) 发现,对奥沙利铂化疗不敏感的结直肠癌患者组织中,补体系统、DNA 修复、脂肪酸代谢、氧化压力反应、脂质氧化、叶酸代谢、铁代谢紊乱、PPAR 信号及周期检查点等通路异常激活 (图 9C),其中与铁死亡相关的多条通路显著改变,包括氧化压力反应、脂质氧化、叶酸代谢和铁代谢紊乱,这些结果为本研究提供了临床证据。

讨论

肿瘤产生耐药的机制非常复杂,包括 DNA 修复能力增强、信号通路激活、氧化应激稳态失衡、凋亡缺陷、药物靶标突变等^[14]。有报道,铁死亡抵抗是导致肿瘤化疗失败的重要原因,其中氧化应激改变、GSH/GPX4 激活、铁稳态及脂质代谢异常是导致铁死亡抵抗的重要机制^[6,15]。有证据表明,以 GPX4 为调控中心的铁死亡途径与肿瘤化疗抵抗关系密切^[16],这不仅拓展了铁死亡相关理论研究,也为逆转肿瘤耐药研究提供了治疗方案。

经典的 GPX4 途径受 GSH 调节,GPX4 与 GSH 协同作用,将毒性的脂质过氧化物还原为无毒的脂质醇,以维持膜磷脂双分子层的稳态。另一方面,GSH 剥夺

或耗竭造成胞内半胱氨酸缺乏,导致 GPX4 抑制或功能失活,引发铁死亡^[17]。因此,GSH/GPX4 通路在调控铁死亡过程中发挥重要作用。不仅如此,直接抑制 GPX4 也可以诱导肿瘤细胞铁死亡。Chen 等^[18]表明,姜黄素类似物通过促使雄激素受体泛素化抑制 GPX4 表达,诱导铁死亡逆转胶质母细胞瘤对替莫唑胺化疗抵抗。肿瘤细胞可通过上调 GSH 代谢酶 (GCL、GGT、GST、GSR 和 GPX 等) 活性,以提高胞内 GSH 水平抵御 ROS、放疗及化疗的损伤,导致化疗抵抗。相反,耗竭或剥夺 GSH 以及下调 GSH 系统代谢酶能够有效逆转肿瘤耐药^[19,20]。本研究发现,HCT116/Oxa 细胞 GSH/GPX4 通路代谢酶 GPX4、GSR 和 GCLM 的表达均显著增加,采用 RSL3 抑制 GPX4 可显著降低 GPX4 和 GSR 的表达;干扰 GPX4 不仅降低 HCT116/Oxa 细胞活力,增加其对奥沙利铂的敏感性,而且可提高脂质过氧化水平和降低 GSH,提示 GSH/GPX4 系统在维持 HCT116/Oxa 细胞铁死亡抵抗,诱导奥沙利铂耐药过程中发挥着关键作用。

临床发现,GSH/GPX4 激活与肿瘤患者的治疗响应直接相关。机制上,该通路激活可对抗化疗药物诱导的氧化应激和氧化损伤,这不仅降低了药物的治疗效果,而且导致患者总生存率降低。如卵巢癌中,GSH/GPX4 激活患者的预后更差,总生存率也更低,且 GPX4 高表达卵巢癌患者对铂类药物的耐药风险是低表达患者的 60.46 倍^[21]。一项新辅助化疗中,GPX4 高表达乳腺癌患者的病理完全缓解率 (pathological complete response, pCR) 较 GPX4 低表达患者低,且 GPX4 可作为乳腺癌患者 pCR 的独立预测因子^[22],提示针对 GSH/GPX4 通路的治疗有望增强对肿瘤患者的化疗效果和

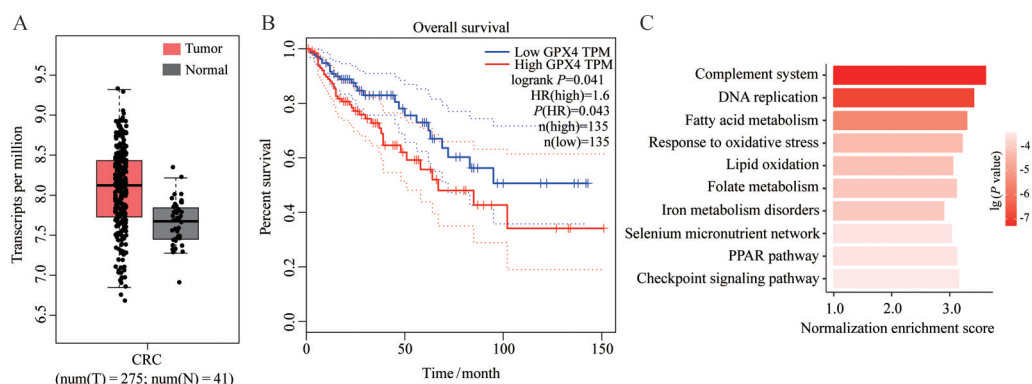


Figure 9 The relationship between GPX4 level and survival in colorectal cancer tissues. A: The expression levels of GPX4 in colorectal cancer tissues and normal tissues; B: Analysis of the relationship between GPX4 level and survival in patients with colorectal cancer; C: Analysis of signaling pathways in tissues of oxaliplatin resistant colorectal cancer patients by Cancer Treatment Response gene signature DataBase (CTR-DataBase)

题, 这些药物不仅抑制 GPX4 酶的活性, 还将导致免疫细胞 GPX4 降解, 触发免疫细胞铁死亡, 这可能会影响肿瘤的免疫治疗。因此, 开发 GPX4 的特异性降解药物仍然是当前面临的难题。

ACSL4 和卵磷脂酰基转移酶 3 (lysophospholipid acyltransferase 5, LPCAT3) 是多不饱和脂肪酸-磷脂 (polyunsaturated fatty acid-phospholipid, PUFA-PL) 合成的两个关键酶, ACSL4 通过催化游离多不饱和脂肪酸与 CoA 连接, 生成 PUFA-CoA, 随后通过 LPCAT3 酯化并渗入磷脂形成 PUFA-PL, 造成细胞膜脂质过氧化物, 导致铁死亡^[23]。相反, ACSL4 和 LPCAT3 失活将引起铁死亡抵抗。蛋白质组数据显示, 与亲本细胞相比, 耐药细胞中 ACSL4 表达显著降低 ($FC_{\text{耐药组/亲本组}} = 0.016, P = 2.3 \times 10^{-4}$), LPCAT3 具有降低趋势 ($FC_{\text{耐药组/亲本组}} = 0.72, P = 0.08$), RSL3 能够促进 ACSL4 的表达, 提示由 ACSL4 介导的脂质过氧化在调节结直肠癌细胞对奥沙利铂铁死亡抵抗中发挥重要作用。文献^[24]报道, ACSL1 通过促进铁死亡抑制因子 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 的棕榈酰化修饰, 抑制 FSP1 降解和细胞铁死亡, 从而导致铂类药物对卵巢癌细胞耐药。也有研究显示, ACSL1 不依赖于 GPX4 可介导共轭亚油酸酯诱发细胞铁死亡, 进而抑制肿瘤增殖和转移^[25], 提示 ACSL1 在铁死亡过程中具有双向调节作用。本研究发现, HCT116/Oxa 中 ACSL1 表达显著降低, 然而 ACSL1 在结直肠癌奥沙利铂耐药中的调节作用尚需进一步探究。

众所周知, 铁超载是造成铁死亡的基础, 也是导致胞内脂质过氧化物积累和诱导细胞铁死亡的必需条件。循环铁以 Fe^{3+} 的形式与转铁蛋白结合, 再经转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor protein 1, TFR1) 转运至胞内, 在核内体中经前列腺六跨膜上皮抗原 3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3, STEAP3) 转化为 Fe^{2+} , 在二价金属离子转运体 (divalent metal-ion transporter-1, DMT1) 介导下, Fe^{2+} 从核内体释放进入不稳定铁池, 过量的铁以铁蛋白重链和轻链形式储存于胞质。铁死亡时, TFR1 表达增加, 而 FTH1 和 FTL 降低^[26]。本研究发现, HCT116/Oxa 中 FTH1 和 FTL 表达增加, 提示胞内储铁增加, 游离铁减少, 这从铁转运、存储及代谢角度解释了 HCT116/Oxa 通过铁死亡抵抗对奥沙利铂耐药的基础。另一方面, RSL3 可以显著抑制 GPX4, 这不仅提高 HCT116/Oxa 对奥沙利铂的敏感性, 而且提高了游离 Fe^{2+} 浓度和脂质过氧化水平, 降低 GSH 浓度, 提示靶向 GPX4 抑制 GSH/GPX4 通路可逆转结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药。此外, 通过分析 CTR-DataBase 发现, 对奥沙利铂

化疗不敏感的结直肠癌患者组织中, 铁代谢、氧化压力和脂质氧化通路被激活, 这些数据为本研究结果提供了佐证。在后续研究中, 本课题组将通过动物模型进一步验证 GSH/GPX4 通路介导的铁死亡抵抗在结直肠癌奥沙利铂耐药中的作用。此外, 本研究还发现与铁死亡有关的其他通路的变化, 包括 Nrf2-ARE 和 PPAR 等, 这些通路在调节结直肠癌细胞对奥沙利铂耐药中的机制有待进一步研究。

致谢: 感谢川北医学院科技创新平台庞宁波博士、陈鑫博士、戴谦博士以及公共卫生学院刘振中教授提供的技术支持。

作者贡献: 刘文虎和常晋霞负责实验设计、数据分析、文稿撰写及修改; 刘文虎、任丹、张金花、吴敏、谢楠执行实验及文献整理。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraie Y, et al. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes [J]. *Curr Drug Targets*, 2021, 22: 998-1009.
- [2] Hashemi M, Esbati N, Rashidi M, et al. Biological landscape and nanostructural view in development and reversal of oxaliplatin resistance in colorectal cancer [J]. *Transl Oncol*, 2024, 40: 101846.
- [3] Zeng K, Li W, Wang Y, et al. Inhibition of CDK1 overcomes oxaliplatin resistance by regulating ACSL4-mediated ferroptosis in colorectal cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10: e2301088.
- [4] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 88.
- [5] Zhao L, Zhou X, Xie F, et al. Ferroptosis in cancer and cancer immunotherapy [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42: 88-116.
- [6] 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.
- [7] Kang X, Huo Y, Jia S, et al. Silenced Linc01134 enhances oxaliplatin sensitivity by facilitating ferroptosis through GPX4 in hepatocarcinoma [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 939605.
- [8] Qu X, Liu B, Wang L, et al. Loss of cancer-associated fibroblast-derived exosomal DACT3-AS1 promotes malignant transformation and ferroptosis-mediated oxaliplatin resistance in gastric cancer [J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 68: 100936.
- [9] Liu WH, Yuan JB, Zhang F, et al. Curcumin inhibits proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells via Wnt3a/ β -catenin/EMT signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 44: 3107-3115.
- [10] Zhang JH, Chang JX, Tang JC, et al. Mechanism of HES1 regulating herceptin resistance in gastric cancer cells by

- ferroptosis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 3354-3365.
- [11] Liu WH, Zhang JH, Wu M, et al. Proteomics study the protective effects of *Panax notoginsenosides* on liver in mice with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 2255-2264.
- [12] Zhang JH, Liu HX, Liu YX, et al. Mechanistic investigation on the hypoglycemic effect of *Panax notoginseng* saponins in type 2 diabetic mice based on plasma metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 1028-1039.
- [13] 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.
- [14] Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. Anticancer drug resistance: an update and perspective [J]. Drug Resist Updat, 2021, 59: 100796.
- [15] Ren Y, Mao X, Xu H, et al. Ferroptosis and EMT: key targets for combating cancer progression and therapy resistance [J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80: 263.
- [16] Wang Y, Zheng L, Shang W, et al. Wnt/beta-catenin signaling confers ferroptosis resistance by targeting GPX4 in gastric cancer [J]. Cell Death Differ, 2022, 29: 2190-2202.
- [17] Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 144-152.
- [18] Chen TC, Chuang JY, Ko CY, et al. AR ubiquitination induced by the curcumin analog suppresses growth of temozolomide-resistant glioblastoma through disrupting GPX4-mediated redox homeostasis [J]. Redox Biol, 2020, 30: 101413.
- [19] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPX4 [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 175-185.
- [20] Zhang W, Liu Y, Liao Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116512.
- [21] Wu X, Shen S, Qin J, et al. High co-expression of SLC7A11 and GPX4 as a predictor of platinum resistance and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer [J]. BJOG, 2022, 129: 40-49.
- [22] Sha R, Xu Y, Yuan C, et al. Predictive and prognostic impact of ferroptosis-related genes ACSL4 and GPX4 on breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. EBioMedicine, 2021, 71: 103560.
- [23] Ding K, Liu C, Li L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism [J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136: 2521-2537.
- [24] Zhang Q, Li N, Deng L, et al. ACSL1-induced ferroptosis and platinum resistance in ovarian cancer by increasing FSP1 N-myristylation and stability [J]. Cell Death Discov, 2023, 9: 83.
- [25] Beatty A, Singh T, Tyurina YY, et al. Ferroptotic cell death triggered by conjugated linolenic acids is mediated by ACSL1 [J]. Nat Commun, 2021, 12: 2244.
- [26] Tang D, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Res, 2021, 31: 107-125.