

## Erastin 诱导人非小细胞肺癌细胞系 A549 凋亡

姜学东<sup>1</sup>, 李文雅<sup>2\*</sup>

- (1. 中国人民武装警察部队辽宁省总队医院 胸外科, 辽宁 沈阳 110034;
2. 中国医科大学附属第一医院 胸外科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:**目的 探讨爱拉斯汀(erastin)对非小细胞肺癌细胞系 A549 凋亡的诱导作用及机制。方法 不同浓度的 erastin 处理 A549 细胞,加入/不加入活性氧集团(ROS)清除剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC),加入/不加入凋亡抑制剂(Z-VAD-FMK);试剂盒检测细胞铁含量;CCK-8 法和流式细胞测量术检测细胞损伤和凋亡等。结果 Erastin 引起 A549 细胞铁离子含量升高和细胞损伤,诱导细胞凋亡( $P<0.05$ ),该作用可被凋亡 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 抑制;Erastin 引起过氧化物(ROS)增加从而诱导细胞凋亡( $P<0.05$ ),该作用可被 ROS 清除剂 NAC 减弱( $P<0.05$ )。结论 Erastin 通过诱导非小细胞肺癌细胞系 A549 内 ROS 产生,引起细胞凋亡,该发现为非小细胞肺癌的诊疗策略提供了参考。

**关键词:** 爱拉斯汀;非小细胞肺癌;凋亡

中图分类号:R394.33 文献标志码:A

## Erastin induces cell apoptosis in human non-small cell lung cancer cell line A549

JIANG Xue-dong<sup>1</sup>, LI Wen-ya<sup>2\*</sup>

- (1. Department of Thoracic Surgery, Liaoning Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Shenyang 110034;
2. Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract: Objective** To explore whether erastin induces apoptosis and to investigate the molecular mechanism in A549 cells. **Methods** A549 cells were treated with erastin at different concentrations, with or without ROS scavenging agent N-acetyl-L-cysteine (NAC) and with or without apoptosis inhibitor (Z-VAD-FMK). Then iron content was measured with Iron Assay Kit, cell injury and apoptosis with CCK-8 and flow cytometry in A549 cells. **Results** Erastin induced the increase of iron content and followed by the injury of A549 cells. Erastin further induced apoptosis of A549 cells ( $P<0.05$ ), which was inhibited by apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK. Erastin induced an increase in peroxides (ROS) then followed by apoptosis ( $P<0.05$ ), which was inhibited by the ROS scavenging agent NAC ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Erastin has an inhibitory effect on NSCLC A549 by inducing intracellular ROS production, which provides evidences for the pathogenesis, diagnosis and treatment of NSCLC.

**Key words:** erastin; non-small cell lung cancer; apoptosis

肺癌(lung cancer)在全球范围内是常见的恶性肿瘤之一,其中约85%患者为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)<sup>[1]</sup>。人体正常生理功能受机体细胞程序性死亡调节,细胞死亡是维持机体内稳态,预防细胞癌变的重要过程。近来,新的研究发现一种非凋亡性细胞死亡——铁死亡(ferroptosis),其特征是脂质过氧化物积累至致死水平而引起的膜损伤,是一种不同于凋亡、坏死及自噬的另外一种程序性细胞死亡形式<sup>[2-3]</sup>;肺癌组织普遍有着更高的活性氧和脂质氧化标志物活性氧集团(reactive oxygen species, ROS)水平,提示ROS和铁死亡在肺癌中发挥着关键作用<sup>[4-6]</sup>。众多研究证实,铁死亡与肿瘤<sup>[7]</sup>、心脑血管疾病<sup>[8]</sup>等疾病密切相关。

爱拉斯汀(erastin/sorafenib)是一种常用的铁死亡诱导剂,通过抑制谷氨酸/胱氨酸反向转运体xCT的活性,使细胞中半胱氨酸(cysteine, Cys)和谷胱甘肽(glutathione, GS-H)缺乏,进而破坏细胞氧化还原稳态,ROS堆积,进而导致铁死亡的发生<sup>[9]</sup>。研究证实,小分子erastin介导细胞内ROS累积,诱导NSCLC细胞系N5CP铁死亡,能有效抑制N5CP生长,提示erastin诱导的铁死亡对NSCLC的化疗有积极作用<sup>[6]</sup>。现已明确ROS可以通过引起细胞损伤,但erastin引起的ROS堆积除了诱导铁死亡外,是否还可调节细胞凋亡尚不明确。本研究就erastin引发肺癌细胞A549的损伤和凋亡机制进行探讨,确定erastin的抑癌作用,以期对肺癌的治疗寻找新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人非小细胞肺癌细胞系A549(成都飞鸥尔生物科技有限公司);细胞培养基RPMI1640和凋亡抑制剂(Z-VAD-FMK)(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific公司);Erastin、staurosporine、N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、CCK-8试剂盒、annexin V-FITC/PI双染试剂盒和CFSE/PI双染试剂盒(Sigma-Aldrich, Merck公司);铁(Fe)含量检测试剂盒(Biovision公司);ROS活性氧检测试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的分组及处理:培养A549细胞,制备A549细胞悬浮液,调节浓度至 $1 \times 10^6$ 细胞/mL,分

为对照组(mock组)和处理组(erastin处理/erastin+Z-VAD-FMK/erastin+NAC)。

1.2.2 CCK-8法分析细胞活力:将细胞浓度调节至 $1 \times 10^6$ 细胞/mL。将细胞按5 000个/孔接种于96孔平板中,贴壁过夜。在每孔中加入不同浓度的erastin(0.1、1、2、4、6、8、10  $\mu\text{mol/L}$ )。处理24 h后,加入CCK-8反应液,避光37  $^{\circ}\text{C}$ 下培养4 h。用分光光度计读取 $A_{450\text{nm}}$ 的吸光度值。

1.2.3 铁(Fe)含量检测试剂盒检测铁含量:用不含EDTA的胰蛋白酶重悬细胞,收集 $1 \times 10^8$ 个细胞,调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$ 个/mL,加入0.2  $\mu\text{L}$  Calcein-Am荧光探针,并将细胞放在37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续孵育7 min。孵育结束后,用Hank's平衡缓冲液冲洗细胞3次,并往体系中加入锥虫蓝(trypsin blue)(0.25%终浓度),室温孵育1 min以确定细胞存活率。最后,在488 nm的激发波长和517 nm的发射波长下测量染色荧光信号。

1.2.4 活性氧检测试剂盒定量分析过氧化物ROS:细胞与羧基-H2DCFDA共培养30 min,去掉培养基,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次。用X71(U-RFL-T)荧光显微镜拍摄绿色荧光信号,并用Image J软件进行定量分析。

1.2.5 流式细胞测量术分析细胞凋亡:用annexin V-FITC/PI双重染色法对 $1 \times 10^6$ 个细胞进行染色,避光孵育20 min。然后,用预冷PBS清洗细胞3次,加入终浓度1%多聚甲醛PBS并在冰上放置10 min。应用3种激光导航流式细胞仪(Beckman Coulter)定量分析坏死(propidium iodide, PI阳性)、非凋亡(双阴性)、早期凋亡(annexin V-FITC阳性和PI阴性)和晚期凋亡细胞(双阳性)。

1.2.6 免疫印迹(Western blot)检测相关剪切蛋白:用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)对20  $\mu\text{g}$ 总蛋白进行分离,并将免疫印迹转移到硝酸纤维素(PVDF)上,用含5%牛血清白蛋白的PBS(BSA, Sigma-Aldrich, Merck)封闭。将抗体按1:1 000比例稀释,加入到PVDF膜上室温孵育1 h。用预冷的T-PBS清洗PVDF膜,然后用1:5 000稀释的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)偶联抗兔二抗与PVDF膜室温孵育30 min。经过3次T-PBS清洗后,用X线片曝光。

1.2.7 CFSE/PI双染色检测细胞凋亡:在erastin处

理 A549 细胞的同时加入 ROS 清除剂 NAC, 共同处理后用 CFSE/PI 双染检测, 检测过程为: 将  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 个孔板中, 并贴壁过夜。加入 100  $\mu\text{L}$  CFSE 荧光染料, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 15 min。去除上清液, 用无菌培养基清洗细胞去除残留的 CFSE。Erastin 处理细胞后, 加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 PI 室温孵育 10 min, 去除上清液, 用无菌培养基清洗细胞去除残留的 PI。最后, 用 X71 荧光显微镜拍摄荧光照片。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 版本进行统计分析, 数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异应用 student-*t* 检验和单向方差分析评估。

## 2 结果

### 2.1 Erastin 诱导 A549 细胞损伤

随着 erastin 浓度增加, A549 细胞活力降低(图

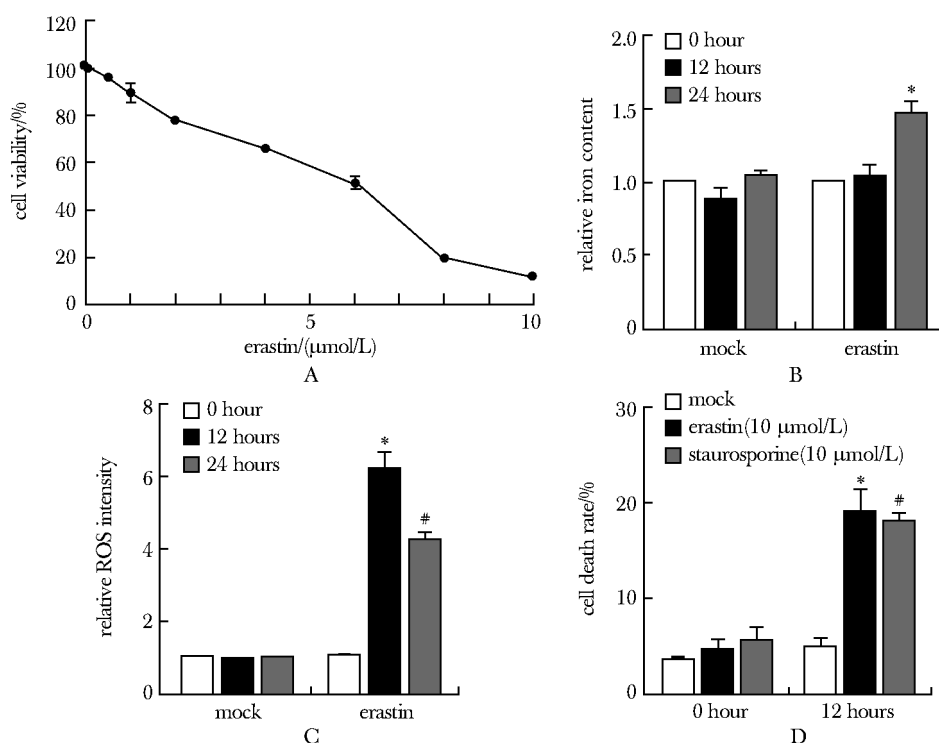
1A) ( $P < 0.05$ ); 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  erastin 处理 A549 细胞 24 h 后引起了铁凋亡的典型表现: 铁离子含量大量升高(图 1B) ( $P < 0.05$ ), 并产生大量过氧化物(图 1C) ( $P < 0.05$ ); PI 染色阳性细胞(死亡细胞)比率显著升高(图 1D) ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Erastin 诱导 A549 细胞凋亡

凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 以不可逆的形式与活化的半胱氨酸蛋白酶 caspases 结合, 从而阻断细胞凋亡。加入 Z-VAD-FMK 后, erastin 引起的 A549 细胞凋亡减少(图 2A); 活化型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved-caspase-3) 和 cleaved-caspase-9 表达量减少(图 2B)。

### 2.3 Erastin 引起 ROS 增加诱导细胞凋亡

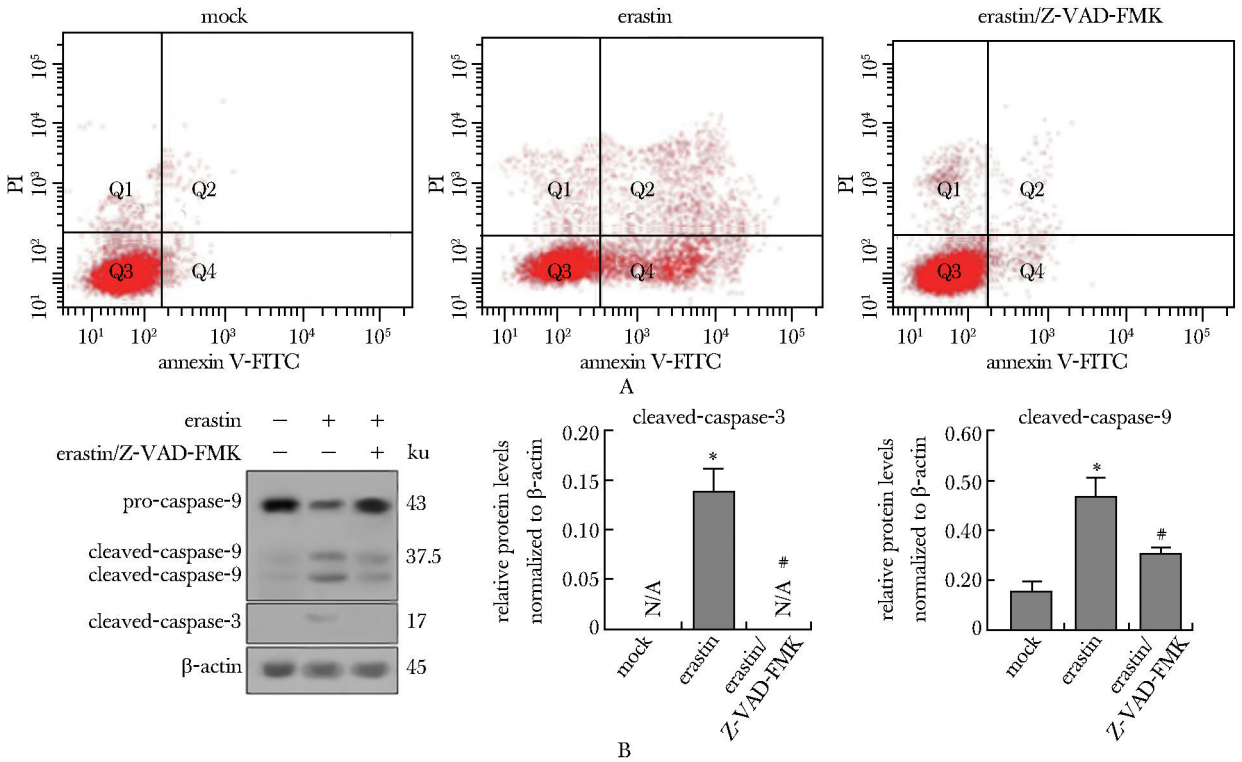
Annexin V-FITC/PI 双染显示, erastin 组 A549 细胞凋亡率增加, 而 erastin/NAC 组 A549 凋亡率降低(图 3)。



A. CCK-8 kit was used to detect the inhibitory rate of A549 cells treated with different concentrations of erastin; B. A549 cells were treated with 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  erastin for different time (0, 12 and 24 hours) to detect the content of iron,  $^*P < 0.05$  compared with 0 hour; C. ROS content was analyzed after A549 cells were treated with 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  erastin for different time (0, 12 and 24 hours),  $^*P < 0.05$  compared with 0 hour,  $^{\#}P < 0.05$  compared with 0 hour; D. the ratio of dead cells was detected by PI staining after A549 cells were treated with 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  erastin or 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  staurosporine for different time (0 and 12 hours),  $^*P < 0.05$  compared with mock group;  $^{\#}P < 0.05$  compared with mock group

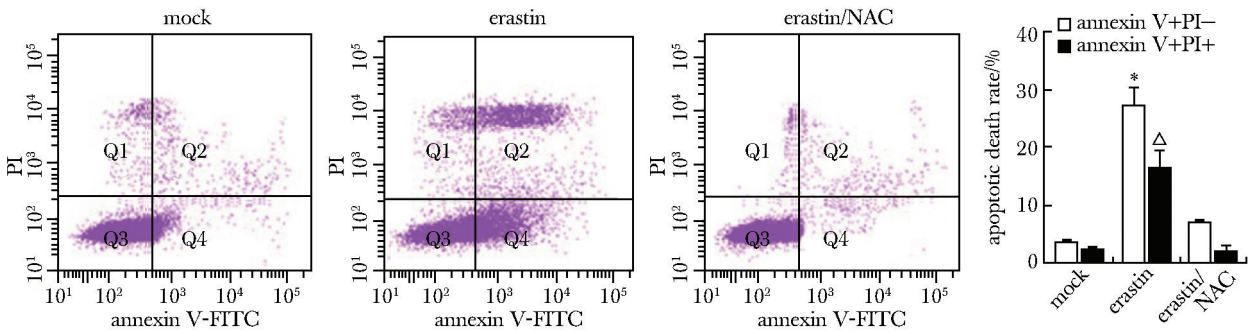
图 1 Erastin 诱导 A549 细胞损伤

Fig 1 Erastin induced A549 cells injury ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



N/A. not applicable; A. A549 cells were treated with Z-VAD-FMK and erastin, and cells apoptosis were detected by annexin V-FITC/PI staining; B. Western blot was used to detect the splicing of caspase-9 related proteins in A549 cells after the addition of V-ZAD-FMK and erastin; \* $P < 0.05$  compared with mock group; # $P < 0.05$  compared with erastin/Z-VAD-FMK group

**图 2 Erastin 诱导 A549 细胞凋亡**  
**Fig 2 Erastin induced A549 cells apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**



A549 cells were treated with NAC and erastin, and cells apoptosis were detected by annexin V-FITC/PI double staining; \* $P < 0.05$ , <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  represent comparisons to mock groups, respectively

**图 3 Erastin 引起 ROS 增加诱导 A549 细胞凋亡**  
**Fig 3 Erastin induced the increase of ROS and A549 cells apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

### 3 讨论

细胞的凋亡与细胞内 caspase 激活和过度氧化有关<sup>[10]</sup>。Erastin 是典型的铁死亡诱导剂,通过引起 ROS 堆积而引起铁死亡;同时,ROS 通过细胞氧化

应激反应诱导细胞凋亡,产生细胞毒性作用<sup>[11]</sup>。ROS、铁死亡和细胞凋亡与肺癌的发病密切相关,但 erastin 引起肺癌细胞死亡的机制尚未明确。先前的研究表明,用 erastin 治疗抗辐射细胞 A549-R,通过诱导谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathion peroxidase



4, GPX4)介导的铁蛋白作用,增强了 A549-R 的辐射敏感性,该研究证实 erastin 对非小细胞肺癌细胞 A549 具有辅助治疗作用<sup>[12]</sup>。本研究通过检测 erastin 处理 A549 细胞后细胞活力、铁离子和 ROC 含量,证实 erastin 可诱导 A549 细胞损伤和凋亡。随后,课题组通过研究凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 的干预,在 erastin 处理 A549 细胞后加入 Z-VAD-FMK,发现细胞凋亡和活化型 caspase-9 和 caspase-3 蛋白含量均减少,证实 erastin 可诱导 A549 细胞凋亡;为了进一步论证 erastin 引起 A549 细胞凋亡的机制,本实验又加入 ROS 清除剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC),证实 erastin 可使细胞内 ROS 产生增加从而诱导 A549 细胞凋亡。已

有研究表明 erastin 引起 ROS 积累增加和 p53 激活,从而诱导非小细胞肺癌细胞系 A549 铁死亡和细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究结果先论证了 erastin 对非小细胞肺癌细胞系 A549 的正向杀伤和诱导凋亡的作用,然后论证其抑制 A549 作用的机制是通过增加细胞内 ROS 产生所致,这一结果与最新的国内外研究结果一致。

综上所述,本研究证实 erastin 通过诱导非小细胞肺癌细胞内 ROS 产生,引起细胞凋亡,说明 erastin 对 A549 的细胞毒性作用同时来源于介导了铁死亡和凋亡过程,并最终达到抗肿瘤作用。本研究实验设计简洁、严谨,为肺癌的发生机制的阐述提供了新的视角,为肺癌的治疗寻找了潜在的靶点。

## 参考文献:

- [1] Smolle E, Leithner K, Olschewski H. Oncogene addiction and tumor mutational burden in non-small-cell lung cancer; Clinical significance and limitations [J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11: 205-215.
- [2] Battaglia AM, Chirillo R, Aversa I, *et al.* Ferroptosis and cancer; mitochondria meet the “Iron maiden” cell death [J], *Cells*, 2020, 9: 1505. doi: 10.3390/cells9061505.
- [3] 徐飞,陈维达,郭溟浩,等. 铁死亡调控机制及在肺癌治疗中的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41: 442-447.
- [4] Wang M, Mao C, Ouyang L, *et al.* Long noncoding RNA LINC00336 inhibits ferroptosis in lung cancer by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26: 2329-2343.
- [5] Chen P, Wu Q, Feng J, *et al.* Erianin, a novel dibenzyl compound in dendrobium extract, inhibits lung cancer cell growth and migration via calcium/calmodulin-dependent ferroptosis[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 51. doi: 10.1038/s41392-020-0149-3.
- [6] Li Y, Yan H, Xu X, *et al.* Erastin/sorafenib induces cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell ferroptosis through inhibition of the Nrf2/xCT pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19: 323-333.
- [7] Lin X, Ping J, Wen Y, *et al.* The mechanism of ferroptosis and applications in tumor treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1061. doi: 10.3389/fphar.2020.01061.
- [8] Wang J, Deng B, Liu Q, *et al.* Pyroptosis and ferroptosis induced by mixed lineage kinase 3 (MLK3) signaling in cardiomyocytes are essential for myocardial fibrosis in response to pressure overload [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 574. doi: 10.1038/s41419-020-02777-3.
- [9] Li C, Dong X, Du W, *et al.* LKB1-AMPK axis negatively regulates ferroptosis by inhibiting fatty acid synthesis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 187. doi: 10.1038/s41392-020-00297-2.
- [10] Su LJ, Zhang JH, Gomez H, *et al.* Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5080843. doi: 10.1155/2019/5080843.
- [11] Espinosa-Oliva AM, García-Revilla J, Alonso-Bellido IM, *et al.* Brainiac caspases; beyond the wall of apoptosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 500. doi: 10.3389/fncel.2019.00500.
- [12] Pan X, Lin Z, Jiang D, *et al.* Erastin decreases radioresistance of NSCLC cells partially by inducing GPX4-mediated ferroptosis [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17: 3001-3008.
- [13] Huang C, Yang M, Deng J, *et al.* Upregulation and activation of p53 by erastin-induced reactive oxygen species contribute to cytotoxic and cytostatic effects in A549 lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40: 2363-2370.