DOI:10.16016/j.2097-0927.202310051

重组新城疫病毒 rL-RVG 抑制 Nrf2-GCLC-GPX4 通路诱导胃癌细胞铁死亡

贡克文[1],田仪督[1],何瑛珏[2],李 洋[2],步雪峰[1] 212000 江苏 镇江,江苏大学附属人民医院:普外科[1],呼吸内科[2]

[摘要] **目的** 探讨重组新城疫病毒(recombinant Newcastle disease virus,rL-RVG)是否通过 Nrf2-GCLC-GPX4 通路引发胃癌细胞铁死亡。**方法** 培养人胃癌 HGC-27 细胞,分别用 rL-RVG、新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)、PBS 溶液(对照组)处理 HGC-27 细胞后,用 CCK-8、Transwell 侵袭、细胞划痕实验检测胃癌 HGC-27 细胞的增殖、侵袭、迁移能力。加入铁死亡促进剂(erastin)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2 related factor 2,Nrf2)促进剂(TBHQ)及抑制剂(ML385)作为干预组,脂质氧化试剂盒检测各组丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量;DCFH-DA 荧光探针及流式细胞仪检测活性氧(reactive oxygen species,ROS)的含量;Western blot、免疫荧光法检测 Nrf2-GCLC-GPX4 通路相关蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,rL-RVG 和 NDV 处理后,细胞的存活率均下降,呈剂量、时间依赖性,且 rL-RVG 处理组较为显著($P<0.05$);NDV 和 rL-RVG 处理组胃癌 HGC-27 细胞迁移、侵袭能力均受到抑制,后者较前者抑制更明显($P<0.05$);与对照组比较,病毒组 Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4 蛋白表达下降($P<0.05$),MDA 水平、ROS 相对表达量上升($P<0.05$),rL-RVG 组上升或下降的趋势较 NDV 组明显,且 erastin 组 SLC7A11、GPX4 蛋白表达下降($P<0.05$);与对照组比较,TBHQ 组、ML385 组 Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4 蛋白表达分别上升、下降($P<0.05$),MDA 水平、ROS 相对表达量分别下降、上升($P<0.05$);与 rL-RVG 组比较,rL-RVG+TBHQ 组、rL-RVG+ML385 组 Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4 蛋白表达分别上升、下降($P<0.05$),MDA 水平、ROS 相对表达量分别下降、上升($P<0.05$)。**结论** 重组新城疫病毒(rL-RVG)可通过 Nrf2-GCLC-GPX4 通路诱导胃癌细胞铁死亡的发生,抑制肿瘤细胞的生长。

[关键词] 重组新城疫病毒;胃癌细胞;铁死亡;核因子 E2 相关因子 2;谷胱甘肽过氧化物酶 4
[中图法分类号] R394.3;R73-362;R735.2 [文献标志码] A

Recombinant Newcastle disease virus rL-RVG induces ferroptosis of gastric cancer cells through inhibiting Nrf2-GCLC-GPX4 pathway

GONG Kewen[1], TIAN Yidu[1], HE Yingjue[2], LI Yang[2], BU Xuefeng[1] [1]Department of General Surgery, [2]Department of Respiratory Medicine, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu Province, 212000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether recombinant Newcastle disease virus (rL-RVG) induces iron death in gastric cancer cells through Nrf2-GCLC-GPX4 pathway. **Methods** After human gastric cancer HGC-27 cells were treated with rL-RVG, Newcastle disease virus (NDV) and PBS solution (control group), respectively, cell proliferation, invasion and migration were detected by CCK-8 assay and Transwell invasion assay and cell scratch test. Ferroptosis accelerator (erastin), and nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) accelerator (TBHQ) and inhibitor (ML385) were added respectively as controls. The content of malondialdehyde (MDA) in each treatment group was detected by lipid oxidation kit. The content of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA fluorescent probe and flow cytometry. Western blotting and immunofluorescence assay were employed to measure the expression levels of Nrf2-GCLC-GPX4 pathway related proteins. **Results** Compared with the control group, the survival rate of HGC-27 cells were significantly decreased after rL-RVG and NDV treatment in a dose- and time-dependent manner, and the effect was more significant in the rL-RVG treatment group ($P<0.05$). The migration and invasion abilities of HGC-27 cells were obviously inhibited in the NDV and rL-RVG treatment groups, and the latter had more notable

[基金项目] 镇江市科技创新资金项目(SH2023004)
[通信作者] 步雪峰,E-mail:xuefengbu05@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

inhibition than the former. The protein levels of Nrf2, GCLC, SLC7A11 and GPX4 were statistically decreased ($P<0.05$), and the contents of MDA and ROS were increased ($P<0.05$) in the virus treatment groups than the control group, with the increasing or decreasing trend more significant in the rL-RVG group than the NDV group. What's more, the protein levels of SLC7A11 and GPX4 were decreased in the erastin group ($P<0.05$). Compared with the control group, those of Nrf2, GCLC, SLC7A11 and GPX4 were increased in the TBHQ group and decreased in the ML385 group ($P<0.05$), while the contents of MDA and ROS were decreased and increased respectively in the above 2 groups ($P<0.05$). Compared with the rL-RVG group, the rL-RVG+TBHQ group and rL-RVG+ML385 group had enhanced and reduced protein expressio of Nrf2, GCLC, SLC7A11 and GPX4, respectively ($P<0.05$), while the contents of MDA and ROS were in opposite trends ($P<0.05$). **Conclusion** rL-RVG can induce ferroptosis of gastric cancer cells through Nrf2-GCLC-GPX4 pathway, and then inhibit the growth of tumor cells.

[**Key words**] recombinant Newcastle disease virus; gastric cancer cells; ferroptosis; nuclear factor E2 related factor 2; glutathione peroxidase 4

Supported by the Science and Technology Innovation Fund of Zhenjiang City (SH2023004). Corresponding author: BU Xuefeng, E-mail: xuefengbu05@163.com

根据2020年全球癌症统计,胃癌的发病率和病死率分别为全球癌症的第5位和第4位[1]。在我国,胃癌是发病率为第5位、病死率第3位的恶性肿瘤,且5年生存率小于40%[2]。铁死亡是由DIXON等[3]在2012年首次提出的一种铁依赖的新型细胞死亡形式。这种死亡是通过抑制胱氨酸/谷氨酸反向转运体[System Xc(-)]引起的[4]。

脂质过氧化是铁死亡的关键特征,与抗氧化系统、铁稳态和脂质代谢相关的一系列基因共同参与铁死亡的调控。核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2,Nrf2)在细胞抗氧化能力中起着至关重要的作用[5]。已有研究证实,抑制谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)可诱导铁死亡,而在头颈癌细胞中可被Nrf2过表达逆转[6]。Nrf2对铁死亡具有拮抗作用,而Keap1过表达诱导的Nrf2下调可靶向抑制谷胱甘肽(glutathione,GSH)合成[7]。谷氨酰胺-半胱氨酸连接酶(GCLC/GCLM)和谷胱甘肽合成酶分别负责GSH的从头合成和催化GSH的生成,均受Nrf2控制[8-9],过表达Nrf2可提高GSH的水平[10]。SLC7A11负责交换谷氨酸和输入胱氨酸合成GSH,拥有的ARE序列可以与Nrf2结合而增强,Nrf2是癌症化疗中的关键靶点,苋属植物提取物鸦胆子苦醇可降低癌症细胞内Nrf2蛋白及基因表达水平,从而增加癌症细胞对顺铂、紫杉醇、依托泊苷等化疗药物的敏感性[11]。GPX4的功能部分依赖于GSH,所以调控Nrf2-GCLC-GPX4通路可能诱导胃癌细胞发生铁死亡。新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)在肿瘤细胞中选择性复制,具有溶瘤作用[12]。研究表明NDV可以通过p53-SLC7A11-GPX4途径引起胶质瘤细胞铁死亡[13]。重组新城疫病毒(recombinant Newcastle disease virus,rL-RVG)是由狂犬病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein,RVG)的片段插入NDV基因P和M之间所构成[14],其抗肿瘤作用强于NDV[15]。本课题组研究发现,rL-RVG、NDV均可引起肺腺癌细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量、p53蛋白表达升高和SLC7A11、GPX4蛋白表达下降,导致肺腺癌细胞铁死亡,且rL-RVG作用较NDV更强[15]。但rL-RVG能否诱导胃癌细胞铁死亡的机制尚不清楚。本研究使用rL-RVG干预胃癌HGC-27细胞,观察其对细胞增殖、侵袭、迁移能力,铁死亡相关物质含量以及Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4蛋白表达水平的影响,旨在探讨rL-RVG在胃癌中可能的分子作用机制,为胃癌的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI 1640培养基、胎牛血清购自上海VivaCell生物公司;人胃癌HGC-27细胞购自无锡菩禾生物公司;NDV及rL-RVG病毒株由哈尔滨兽医研究所赠予;铁死亡促进剂(erastin)购自上海阿拉丁生化公司;Hoechst 33342染色液、ROS检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒购自上海碧云天生物公司;CCK-8细胞活力检测试剂盒购自安徽白鲨生物公司;兔抗Nrf2多克隆抗体、鼠抗β-actin多克隆抗体购自武汉三鹰生物公司;兔抗SLC7A11多克隆抗体、兔抗GPX4多克隆抗体、兔抗GCLC多克隆抗体、羊抗兔IgG H+L(HRP)、羊抗鼠IgG H+L(HRP)购自武汉博士德生物公司;5%青霉素/链霉素/庆大霉素三抗购自武汉塞维尔生物公司;Nrf2促进剂(TBHQ)、Nrf2抑制剂(ML385)购自美国MCE公司;RIPA裂解缓冲液、BCA蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝生物公司;SDS-PAGE凝胶电泳试剂盒购自上海雅酶生物公司;PVDF膜购自美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌HGC-27细胞在含10%

胎牛血清和5%青霉素/链霉素/庆大霉素三抗的RPMI 1640培养基中培养,并在37 ℃、5% CO_2的培养箱生长。细胞接种于6孔板中,当细胞贴壁达板底面积70%~80%时,按照完全随机化进行分组,分为对照组(control组)、NDV组、rL-RVG组、铁死亡促进剂erastin干预组(erastin组)、Nrf2促进剂TBHQ干预组(TBHQ组)、Nrf2抑制剂ML385干预组(ML385组)、NDV+TBHQ组、NDV+ML385组、rL-RVG+TBHQ组、rL-RVG+ML385组。对照组加入PBS溶液400 μL;rL-RVG和NDV病毒原液(10^6 TCID50/0.1 mL)用无血清RPMI 1640培养基稀释10^1、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6倍;各病毒组分别加入稀释10^3倍病毒溶液400 μL;erastin、TBHQ和ML385均用DMSO溶液配制浓度为10 mmol/L的储备液,促进剂或激活剂组分别加入10 μL对应的TBHQ及ML385溶液,培养24 h后收集各组细胞进行相关实验。

1.2.2 CCK-8实验 将胃癌HGC-27细胞置于37 ℃条件下解冻复苏,1 000×*g*离心5 min,洗涤后加入10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,以约2×10^4个/孔接种在96孔板培养24 h,各孔中加入不同稀释倍数病毒溶液20 μL后继续处理24 h,以未处理细胞作对照(control),使用CCK-8细胞活力检测试剂盒测定各孔吸光度值(optical density,OD),计算各浓度处理组细胞存活率:[OD(加药)-OD(对照)]/[OD(0加药)-OD(对照)]×100%。根据该结果选定一个最优病毒稀释倍数,重复上述操作,每孔中加入适量该浓度病毒溶液,分别培养24、48、72 h,按上述操作检测并计算细胞存活率。

1.2.3 丙二醛检测 不同因素处理胃癌HGC-27细胞24 h后,向各组加入RIPA裂解液,裂解后12 000×*g*离心5 min,提取总蛋白,用BCA法测出其浓度后每组取出300 μL(重复3次),按照MDA检测试剂盒步骤进行,根据公式计算MDA浓度。MDA=(样本管OD值-对照组OD值)/(标准品管OD值-对照组OD值)×标准品浓度/待测蛋白样本浓度。

1.2.4 DCFH-DA荧光探针及流式细胞仪检测 将胃癌HGC-27细胞接种于12孔板中,各组处理后用PBS溶液洗涤细胞,按3∶1 000的比例向RPMI 1640培养基溶液中加入DCFH-DA探针,置入37 ℃细胞培养箱孵育30 min,用RPMI 1640培养基溶液洗涤细胞,于荧光显微镜下拍摄;或处理后胰酶消化细胞,转移至EP管中,多次PBS溶液洗涤、离心、重悬细胞后,加入DCFH-DA荧光探针,37 ℃细胞培养箱孵育30 min,上机检测ROS含量。

1.2.5 Western blot检测 RIPA溶液裂解已处理的各组细胞,完成蛋白溶液制备。取15 μL蛋白溶液进行SDS-PAGE电泳,然后转至PVDF膜上,脱脂奶粉融于TBST溶液用于制备封闭液,膜封闭1.5 h,根据目的蛋白Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4的KD值将其裁下,分别孵育对应的一抗抗体,4 ℃冰箱过夜后,TBST溶液漂洗30 min,孵育二抗抗体,继续TBST溶液漂洗30 min,用仪器进行蛋白曝光显影。

1.2.6 细胞划痕实验 在6孔板中接种细胞,当细胞贴壁率达80%,洗净培养液,用10 μL枪头垂直于板底做3条直线,分别设为对照组、NDV组、rL-RVG组,并向对照组中加入PBS溶液,向处理组中分别加入NDV、rL-RVG病毒溶液,在显微镜下拍照记录划线宽度。6孔板放置培养箱培养24 h后取出,在显微镜下再次拍照记录划线宽度。

1.2.7 Transwell侵袭实验 将胃癌HGC-27细胞分为对照组、NDV组、rL-RVG组,处理24 h后,经胰酶消化、离心,用无血清1640培养基重悬,并进行细胞计数,往24孔板中加600 μL 10%血清培养基,放入小室,加1×10^4个细胞,置于37 ℃、5% CO_2培养箱培养24 h后,用4%多聚甲醛固定、0.1%结晶紫染色,待晾干后,显微镜下随机选取5个视野并计数。

1.2.8 免疫荧光染色 将各组胃癌HGC-27细胞置于室温下4%多聚甲醛固定4 h,PBS清洗3次,0.5% Triton X100室温处理30 min,PBS清洗3次,5% BSA封闭1 h,在4 ℃环境下Nrf2一抗孵育8 h,PBS洗去一抗,二抗室温孵育1 h,PBS冲洗3次,Hoechst 33342细胞核染色30 min,PBS清洗后置于荧光显微镜下拍照。

1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.4.1统计软件进行数据分析,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用LSD-*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rL-RVG抑制胃癌HGC-27细胞增殖活性

CCK-8实验检测结果显示,与对照组比较,rL-RVG和NDV处理胃癌HGC-27细胞24 h后,细胞的存活率随着病毒浓度的增加逐渐下降($P<0.05$,图1A)。当稀释倍数为10^4时,细胞的活力均>50%;当稀释倍数为10^3时,NDV组细胞活力>50%,而rL-RVG组细胞活力<50%,故选择与IC_{50}相近的10^3倍病毒溶液进行后续的实验,用该浓度的rL-RVG和NDV处理胃癌HGC-27细胞24、48、72 h后计算存活率。结果显示,胃癌HGC-27细胞的存活率随着处理时间的延长逐渐下降($P<0.05$,图1B)。结果表明:rL-RVG及NDV能抑制胃癌HGC-27细胞的增殖,且rL-RVG抑制能力强于NDV。

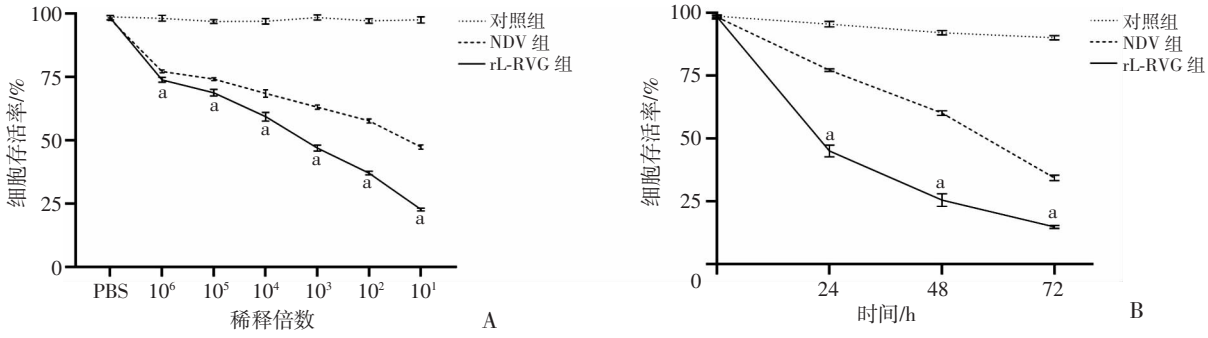
2.2 rL-RVG抑制胃癌HGC-27细胞的迁移和侵袭

采用细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力。rL-RVG和NDV处理24 h后,胃癌HGC-27细胞的迁

移率降低($P<0.05$,图 2A、B)。Transwell 侵袭实验结果显示,与对照组比较,rL-RVG 及 NDV 处理后均能抑制胃癌 HGC-27 细胞的侵袭($P<0.05$,图 2C、D)。说明 NDV 和 rL-RVG 可抑制胃癌 HGC-27 细胞迁移、侵袭能力,且 rL-RVG 抑制效果较 NDV 明显。

2.3　rL-RVG 诱导胃癌 HGC-27 细胞发生铁死亡

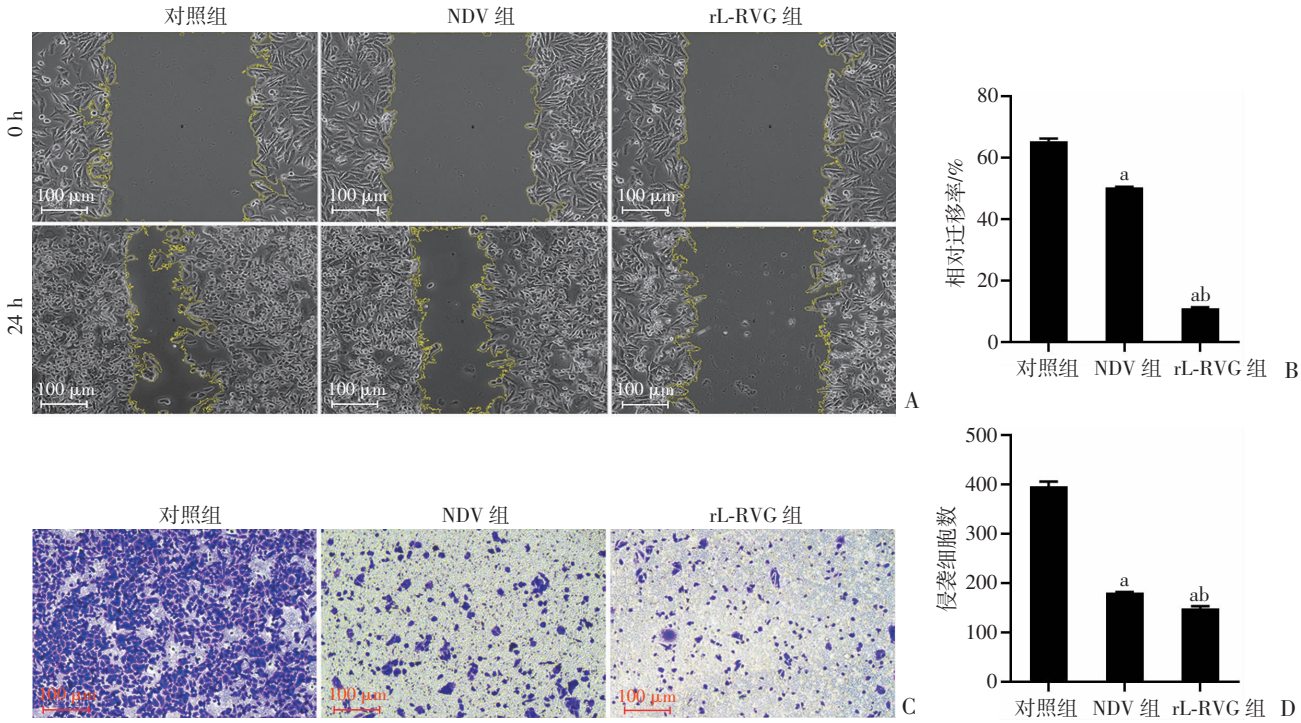
进一步探讨 rL-RVG 及 NDV 是否诱导铁死亡。铁死亡的发生会产生大量的 ROS,因此采用 DCFH-DA 染色胃癌 HGC-27 细胞,在荧光显微镜下拍摄并使用流式细胞仪检测其 ROS 含量。与对照组比较,rL-RVG 组和 NDV 组荧光强度均增加,rL-RVG 组的荧光强度较 NDV 组增加明显($P<0.05$,图 3A、B);与对照组比较,rL-RVG 组、NDV 组和 ML385 组 ROS 相对表达量及细胞内 MDA 含量升高,TBHQ 组 ROS 相对表达量及细胞内 MDA 含量降低,上述 rL-RVG 组升高趋势较 NDV 组明显($P<0.05$);与 rL-RVG 组比较,rL-RVG+TBHQ 组 ROS 相对表达量及细胞内 MDA 含量降低($P<0.05$),rL-RVG+ML385 组 ROS 相对表达量及细胞内 MDA 含量升高($P<0.05$,图 3C~E);与 NDV 组比较,NDV+TBHQ 组细胞内 MDA 含量降低($P<0.05$),NDV+ML385 组细胞内 MDA 含量升高($P<0.05$,图 3E)。结果表明,病毒感染胃癌 HGC-27 细胞后可引起 ROS 荧光强度、ROS 及 MDA 含量升高,其中 rL-RVG 组升高程度较大。



a:$P<0.05$,与 NDV 组比较

A:不同病毒浓度对细胞存活率的影响;B:同一病毒浓度不同时间对细胞存活率的影响

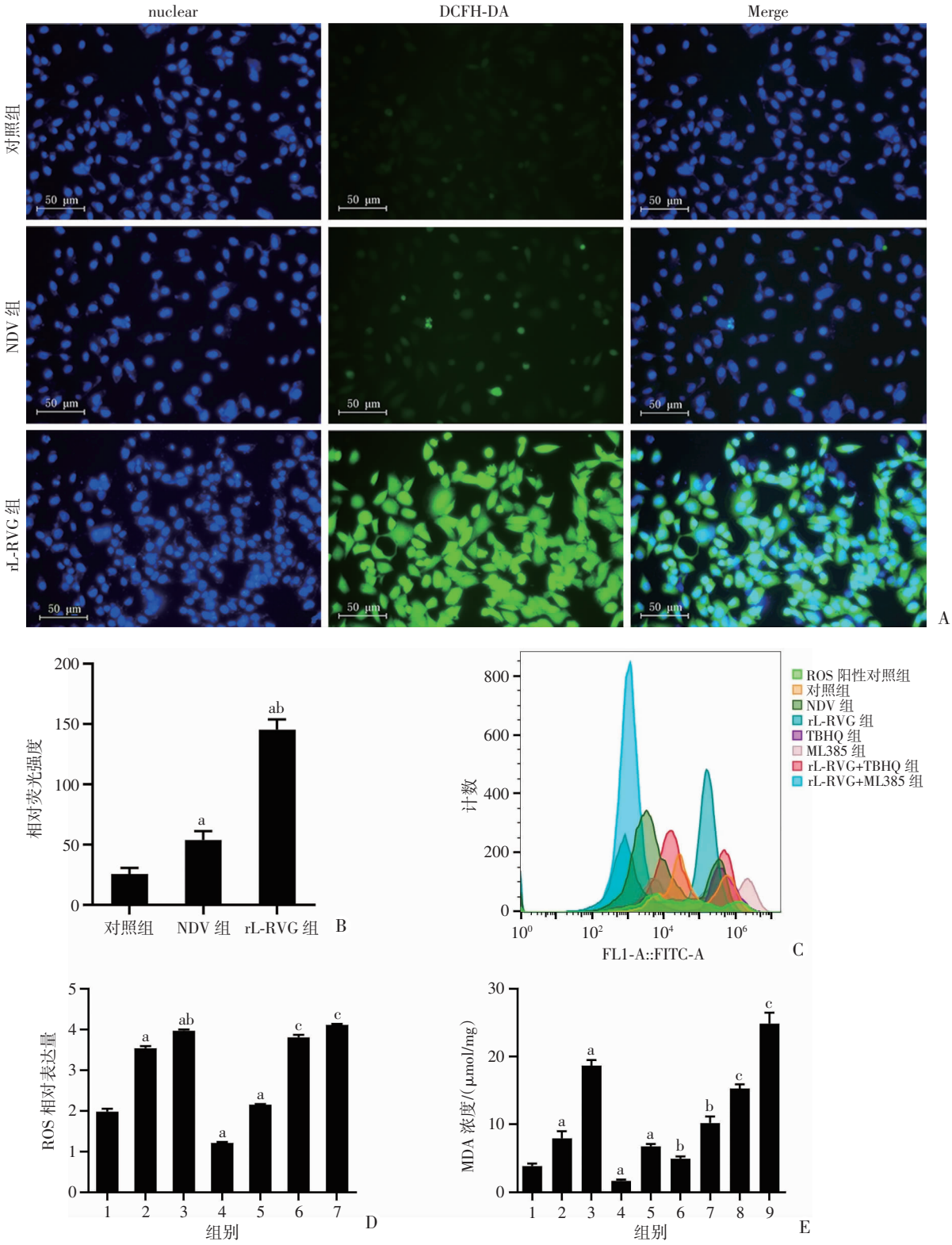
图 1　重组新城疫病毒 rL-RVG 对胃癌 HGC-27 细胞存活率的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 NDV 组比较

A:划痕实验观察各组细胞的迁移情况;B:各组细胞迁移率分析;C:Transwell 侵袭实验观察各组细胞的侵袭情况;D:各组侵袭细胞数分析

图 2　重组新城疫病毒 rL-RVG 对胃癌 HGC-27 细胞侵袭和迁移能力的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 NDV 组比较;c:$P<0.05$,与 rL-RVG 组比较

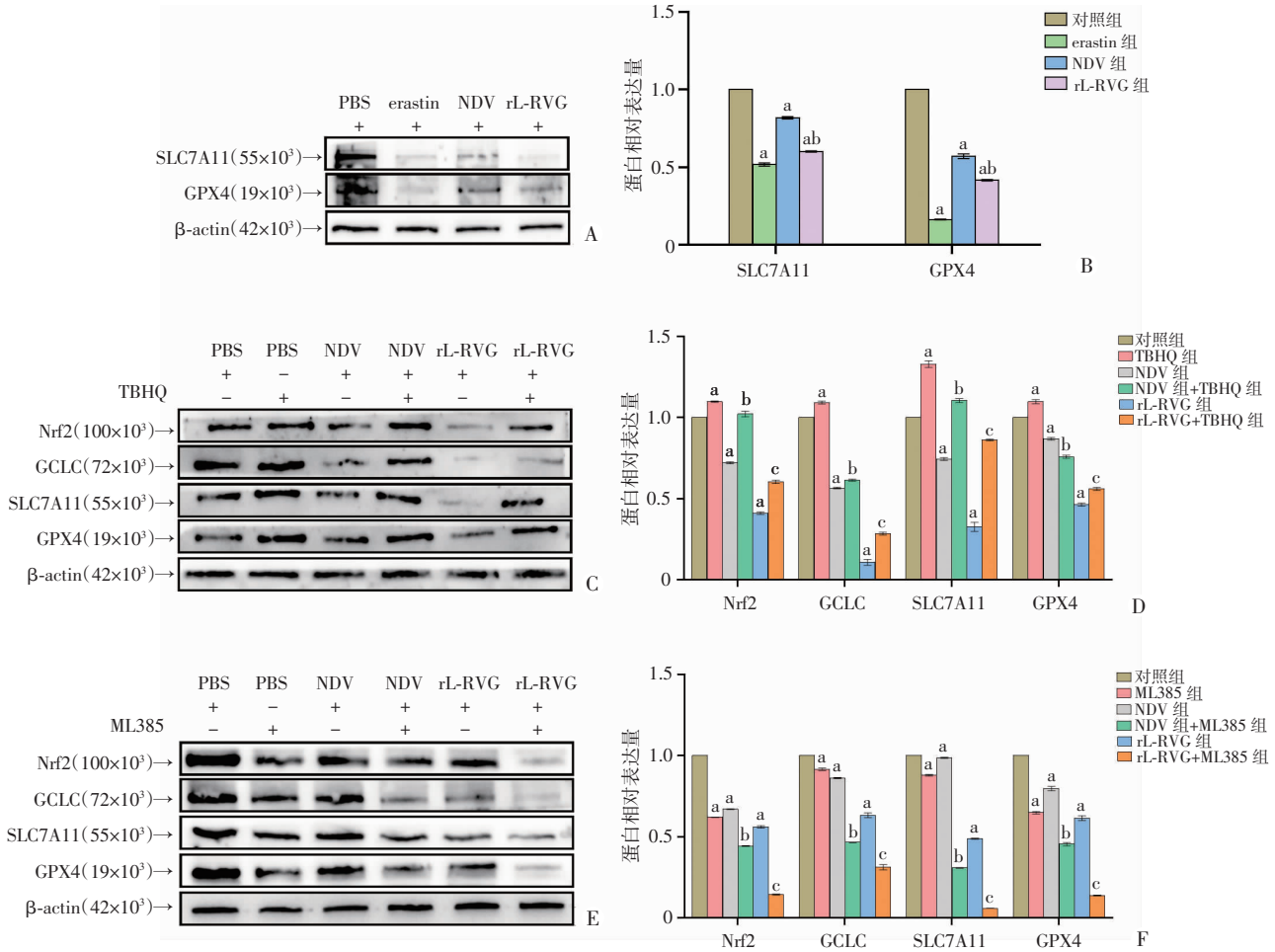
A:荧光显微镜观察各组细胞 ROS 的荧光强度;B:各组相对荧光强度比较;C:流式细胞仪检测各组细胞 ROS 的水平;D:各组 ROS 相对表达量比较　1:对照组;2:NDV 组;3:rL-RVG 组;4:TBHQ 组;5:ML385 组;6:rL-RVG+TBHQ 组;7:rL-RVG+ML385 组;E:各组细胞中 MDA 浓度比较　1:对照组;2:NDV 组;3:rL-RVG 组;4:TBHQ 组;5:ML385 组;6:NDV 组+TBHQ 组;7:NDV 组+ML385 组;8:rL-RVG+TBHQ 组;9:rL-RVG+ML385 组

图 3　重组新城疫病毒 rL-RVG 感染胃癌 HGC-27 细胞后对 ROS 荧光强度及相对表达量、MDA 水平的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.4　rL-RVG 对胃癌 HGC-27 细胞 Nrf2-GCLC-GPX4 通路相关蛋白表达及 erastin、TBHQ、ML385 干预的影响

2.4.1　rL-RVG 对胃癌 HGC-27 细胞 Nrf2-GCLC-GPX4 通路相关蛋白表达的影响　Western blot 检测 rL-RVG、NDV 感染胃癌 HGC-27 细胞后,细胞中 Nrf2、GCLC、SLC7A11 和 GPX4 的表达情况。实验结果显示,与对照组比较,rL-RVG 组和 NDV 组细胞 Nrf2、GCLC、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达均下降,且 rL-RVG 组相对表达量较 NDV 组明显降低($P<0.05$,图 4C、D);与对照组比较,铁死亡促进剂 erastin 组 SLC7A11、GPX4 蛋白表达下降($P<0.05$,图 4A、B),证实病毒可诱导胃癌 HGC-27 细胞铁死亡的发生。与对照组比较,Nrf2 促进剂 TBHQ 组、Nrf2 抑制剂 ML385 组相关蛋白表达分别下降、升高($P<0.05$,图 4C~F);与 rL-RVG 组比较,rL-RVG+TBHQ 组相关蛋白表达上升($P<0.05$,图 4C、D),rL-RVG+ML385 组相关蛋白表达下降($P<0.05$);与 NDV 组比较,NDV+TBHQ 组相关蛋白表达升高($P<0.05$),NDV+ML385 组相关蛋白表达下降($P<0.05$,图 4C~F)。综上,病毒组通路相关蛋白表达下降,rL-RVG 组下降趋势较 NDV 组明显;TBHQ、ML385 预处理后相关蛋白表达分别升高、下降。

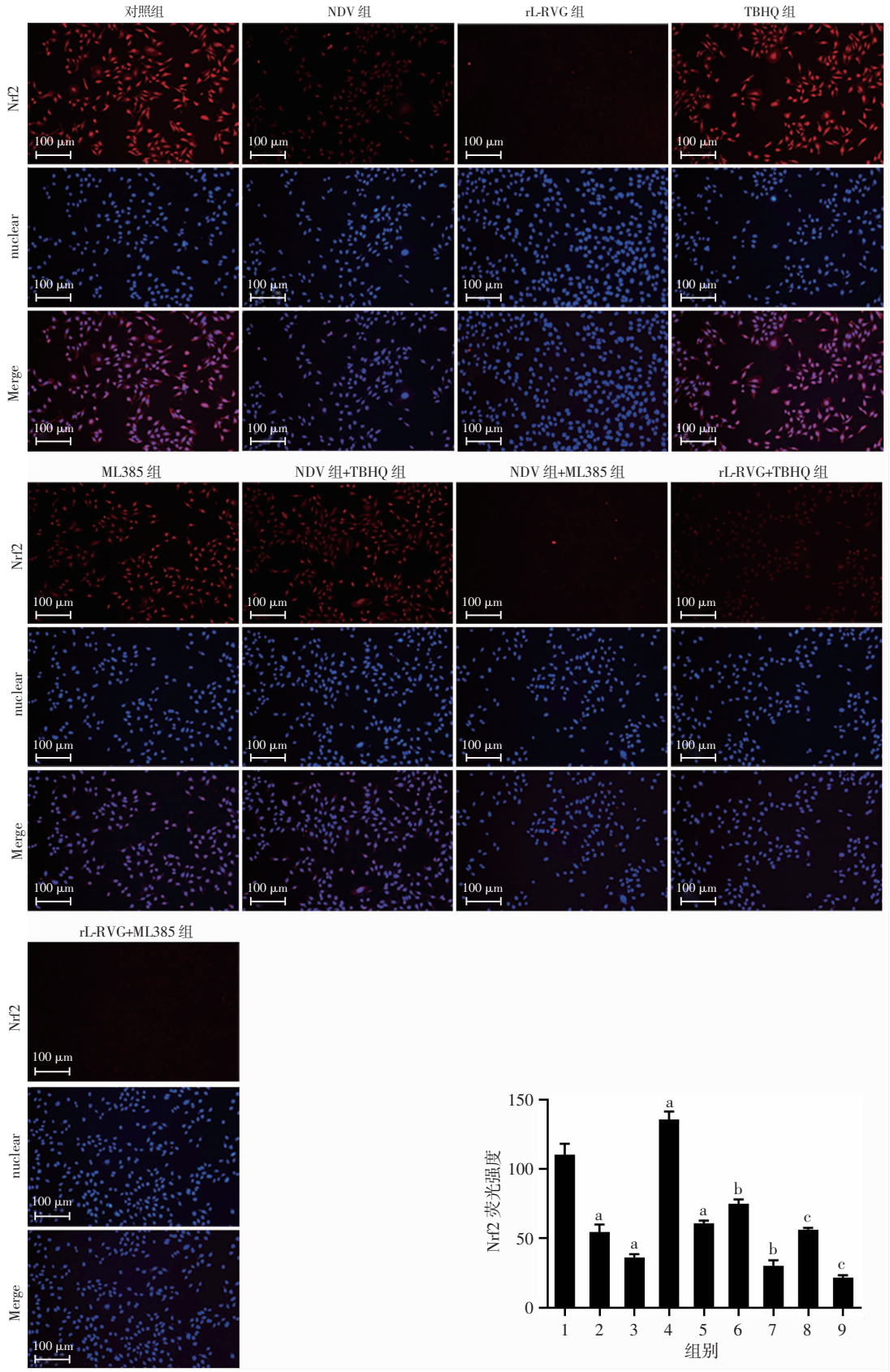
2.4.2　rL-RVG 感染及 TBHQ、ML385 处理胃癌 HGC-27 细胞后 Nrf2 的免疫荧光检测　与对照组比较,Nrf2 在 NDV 组、rL-RVG 组的表达降低,rL-RVG 组下降更明显($P<0.05$)。与对照组比较,Nrf2 促进剂 TBHQ 组及 Nrf2 抑制剂 ML385 组 Nrf2 荧光强度分别升高及降低;与 rL-RVG 组比较,rL-RVG+TBHQ 组及 rL-RVG+ML385 组 Nrf2 荧光强度分别升高及降低($P<0.05$);与 NDV 组比较,NDV+TBHQ 组及 NDV+ML385 组 Nrf2 荧光强度分别升高及降低($P<0.05$)。综上所述,rL-RVG 能抑制 Nrf2 表达从而降低 Nrf2 的免疫荧光强度($P<0.05$,图 5)。



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 NDV 组比较;c:$P<0.05$,与 rL-RVG 组比较

A、B:病毒及 erastin 感染细胞后 SLC7A11、GPX4 蛋白表达及相对表达量分析;C、D:病毒感染及 TBHQ 干预细胞后 Nrf2-GCLC-GPX4 通路相关蛋白表达及相对表达量分析;E、F:病毒感染及 ML385 干预细胞后 Nrf2-GCLC-GPX4 通路相关蛋白表达及相对表达量分析

图 4　不同处理因素感染胃癌 HGC-27 细胞后相关蛋白的表达情况($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:NDV 组;3:rL-RVG 组;4:TBHQ 组;5:ML385 组;6:NDV 组+TBHQ 组;7:NDV 组+ML385 组;8:rL-RVG+TBHQ 组;9:rL-RVG+ML385 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 NDV 组比较;c:$P<0.05$,与 rL-RVG 组比较

图 5 免疫荧光观察各组胃癌 HGC-27 细胞 Nrf2 的表达情况及荧光强度比较($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

胃癌是世界第五大常见的恶性肿瘤,手术是目前被认为唯一有效的治疗方式。然而,即使术中完全切除,仍有较大复发的概率[16]。而最近的一些靶向治疗试验并未成功[17-18],探索新的治疗药物及靶点具有重要意义。研究表明,NDV 具有较好的溶瘤作用,且对正常细胞没有杀伤作用[12,19-20];表达 RVG 的重组新城疫病毒 rL-RVG 可抑制胃癌 BGC 细胞的增殖、侵袭及迁移[21]。本研究发现,rL-RVG 通过 Nrf2-GCLC-GPX4 通路诱导胃癌 HGC-27 细胞铁死亡,抑制细胞的增殖、迁移、侵袭,从而起到抗肿瘤作用。

铁死亡是一种铁依赖的脂质过氧化途径,主要是由于细胞内 ROS 积累、脂质过氧化增加、MDA 的产生增加等引起的[22]。铁死亡可以提高癌细胞对药物的敏感性,逆转癌细胞的化疗耐药,被认为是治疗包括恶性肿瘤在内的人类疾病的潜在治疗靶点[23-24]。铁死亡能抑制肺癌、结直肠癌、口腔癌、胃癌等肿瘤细胞的增殖[25-27]。相关研究表明,蛋白精氨酸甲基转移酶 4 与 Nrf2 相互作用,促进其酶促甲基化,从而限制 Nrf2 的核易位,进而抑制 GPX4 的转录[28]。

Nrf2 能够调节抗氧化和亲电应激基因的表达,在细胞抗氧化能力中起着至关重要的作用[4]。此外,Nrf2 还参与脂质代谢、铁稳态和能量代谢等其他重要通路。激活的 Nrf2 对铁死亡具有抑制作用,而铁死亡促进剂 erastin 诱导的 Nrf2 下调可靶向抑制 GSH 的合成。GPX4 既是抗氧化脂质损伤的守护者,也是生理上重要的脂质信号的关键调节剂,这两种功能的相互平衡是维持细胞稳态的关键[29]。System Xc(-)系统可将胱氨酸运输进入细胞,细胞内胱氨酸被还原为半胱氨酸,促进 GSH 的合成[30-31]。因此,抑制 System Xc(-)系统会导致 GSH 合成障碍及 GPX4 表达下降,诱导细胞铁死亡的发生,而 GPX4 过表达可以阻止细胞发生氧化损伤及铁死亡。研究发现 SLC7A11 通过激活 Nrf2-keap1 信号通路,促进胶质母细胞瘤的铁死亡,表明 SLC7A11 是 Nrf2 在癌症化疗中的关键靶点[32]。在 GSH 合成和代谢相关蛋白方面,谷氨酰胺-半胱氨酸连接酶(GCLC/GCLM)和 GSH 合成酶的催化和调节亚基分别负责 GSH 的从头合成和催化 GSH 的生成,它们都由 Nrf2 调节[8-9]。本研究结果显示,以 rL-RVG 及 NDV 处理胃癌 HGC-27 细胞,可抑制细胞的增殖、侵袭、迁移能力,增加细胞内 MDA 的含量,导致大量 ROS 的积累和 Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4 蛋白表达下调,表明 rL-RVG 及 NDV 均可诱导胃癌 HGC-27 细胞发生铁死亡,且 rL-RVG 作用效果更明显。病毒及铁死亡促进剂 erastin 均可引起 SLC7A11、GPX4 蛋白表达下降,证明病毒可诱导胃癌细胞发生铁死亡。用 Nrf2 抑制剂 ML385 处理胃癌 HGC-27 细胞,可显著降低 Nrf2、GCLC、SLC7A11、GPX4 蛋白的表达,当其与病毒联合感染胃癌 HGC-27 细胞时,相关蛋白的表达水平较单一 ML385 组及病毒组低。因此,rL-RVG 可抑制 Nrf2-GCLC-GPX4 通路诱导胃癌细胞铁死亡。

综上所述,rL-RVG 既有溶瘤作用,也可抑制 Nrf2-GCLC-GPX4 通路下调相关蛋白的表达,降低 GPX4 的合成,导致细胞内大量活性氧蓄积,诱发脂质过氧化及铁死亡,抑制胃癌 HGC-27 细胞的增殖、迁移、侵袭,起抗肿瘤作用。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国胃癌筛查与早诊早治指南(2022, 北京)[J]. 中国肿瘤, 2022, 31(7): 488-527. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2022.07.A002.
HE J, CHEN W Q, LI Z S, *et al*. China guideline for the screening, early detection and early treatment of gastric cancer (2022, Beijing)[J]. China Cancer, 2022, 31(7): 488-527. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2022.07.A002.

[3] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, *et al*. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5):1060-1072. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

[4] JIANG X J, STOCKWELL B, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.

[5] DÄCHERT J, EHRENFELD V, HABERMANN K, *et al*. Targeting ferroptosis in rhabdomyosarcoma cells[J]. Int J Cancer, 2020, 146(2): 510-520. DOI: 10.1002/ijc.32496.

[6] SHIN D, KIM E H, LEE J, *et al*. Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 454-462. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.426.

[7] LU J, ZHAO Y N, LIU M T, *et al*. Toward improved human health: Nrf2 plays a critical role in regulating ferroptosis[J]. Food Funct, 2021, 12(20): 9583-9606. DOI: 10.1039/d1fo01036k.

[8] LIAN G J, GNANAPRAKASAM J R, WANG T T, *et al*. Glutathione *de novo* synthesis but not recycling process coordinates with glutamine catabolism to control redox homeostasis and directs murine T cell differentiation[J]. eLife, 2018, 7: e36158. DOI: 10.7554/eLife.36158.

[9] SONG X H, LONG D X. Nrf2 and ferroptosis: a new research direction for neurodegenerative diseases[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 267. DOI: 10.3389/fnins.2020.00267.

[10] HE F, ANTONUCCI L, KARIN M. NRF_2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer [J]. Carcinogenesis, 2020, 41(4): 405-416. DOI: 10.1093/carcin/bgaa039.

[11] WANG X M, WANG Y L, HUANG D M, *et al*. Astragaloside IV regulates the ferroptosis signaling pathway *via* the Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis to inhibit $PM_{2.5}$-mediated lung injury in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 112: 109186. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109186.

[12] BURMAN B, PESCI G, ZAMARIN D. Newcastle disease virus at the forefront of cancer immunotherapy[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(12): 3552. DOI: 10.3390/cancers12123552.

[13] KAN X J, YIN Y C, SONG C P, *et al*. Newcastle-disease-virus-induced ferroptosis through nutrient deprivation and ferritinophagy in tumor cells[J]. iScience, 2021, 24(8): 102837. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102837.

[14] BU X F, ZHAO Y H, ZHANG Z J, *et al*. Recombinant Newcastle disease virus (rL-RVG) triggers autophagy and apoptosis in gastric carcinoma cells by inducing ER stress [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(5): 924-936. DOI: 2156-6976/ajcr0025130.

[15] 张珍珍, 李洋, 高生宝, 等. 重组新城疫病毒 rL-RVG 抑制人肺腺癌细胞系增殖[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(10): 1549-1556.. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.10.1549.

ZHANG Z Z, LI Y, GAO S B, *et al*. Recombinant Newcastle virus rL-RVG inhibits proliferation of human lung adenocarcinoma cell lines[J]. Basic Clin Med, 2023, 43(10): 1549-1556.. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.10.1549.

[16] GU R J, XIA Y W, LI P F, *et al*. Ferroptosis and its role in gastric cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 860344. DOI: 10.3389/fcell.2022.860344.

[17] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al*. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[18] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, *et al*. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012. DOI: 10.3390/ijms21114012.

[19] SCHIRRMACHER V. Molecular mechanisms of anti-neoplastic and immune stimulatory properties of oncolytic Newcastle disease virus[J]. Biomedicines, 2022, 10(3): 562. DOI: 10.3390/biomedicines10030562.

[20] MENG Q X, HE J, ZHONG L P, *et al*. Advances in the study of antitumour immunotherapy for Newcastle disease virus[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(11): 2294-2302. DOI: 10.7150/ijms.59185.

[21] 尹超云, 张垚, 陈振威, 等. 重组新城疫病毒 IL29 抑制人胃癌细胞系 BGC 的增殖与迁移[J]. 基础医学与临床, 2020, 40(3): 368-373. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6325.2020.03.021.

YIN C Y, ZHANG Y, CHEN Z W, *et al*. rL-IL29 inhibits proliferation and migration of human gastric cancer cell line BGC[J]. Basic Clin Med, 2020, 40(3): 368-373. DOI: 10.3969/j.issn.1001-6325.2020.03.021.

[22] LI M T, HE Y L, PENG C, *et al*. Erianin inhibits human cervical cancer cell through regulation of tumor protein p53 via the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 16(4): 5006-5012. DOI: 10.3892/ol.2018.9267.

[23] ZHAO Y N, LU J, MAO A K, *et al*. Autophagy inhibition plays a protective role in ferroptosis induced by alcohol via the p62-Keap1-Nrf2 pathway [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(33): 9671-9683. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c03751.

[24] TANG D L, CHEN X, KANG R, *et al*. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Res, 2021, 31(2): 107-125. DOI: 10.1038/s41422-020-00441-1.

[25] CHEN P, WU Q B, 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(1): 51. DOI: 10.1038/s41392-020-0149-3.

[26] WEI R R, ZHAO Y Q, WANG J, *et al*. Tagitinin C induces ferroptosis through PERK-Nrf2-HO-1 signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(11): 2703-2717. DOI: 10.7150/ijbs.59404.

[27] XU J C, TIAN X Y, HAN R, *et al*. Erianin inhibits oral cancer cell growth, migration, and invasion via the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2022, 12(10): 437-445. DOI: 10.4103/2221-1691.357743.

[28] WANG Y L, YAN S, LIU X M, *et al*. PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(10): 1982-1995. DOI: 10.1038/s41418-022-00990-5.

[29] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 175-185. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027.

[30] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620. DOI: 10.1007/s13238-020-00789-5.

[31] FORCINA G C, DIXON S J. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis [J]. Proteomics, 2019, 19(18): e1800311. DOI: 10.1002/pmic.201800311.

[32] KAJARABILLE N, LATUNDE-DADA G O. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4968. DOI: 10.3390/ijms20194968.

(**收稿**:2023-10-13;**修回**:2023-12-26)

(编辑 汪勤俭)