

网络出版时间:2023-07-13 17:24:08 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.r.20230713.1438.032.html>

哺乳动物细胞 ACBD3 敲低对铁死亡的影响

邱 荣, 马山川, 钱 影, 曹新旺

摘要 目的 研究高尔基体蛋白 ACBD3 敲低在哺乳动物细胞铁死亡过程中的作用。方法 利用 shRNA 敲低 ACBD3, 结合铁死亡诱导剂处理, 测定不同处理组细胞活力、细胞中铁水平、活性氧(ROS)水平以及脂质过氧化物水平, 综合分析 ACBD3 在铁死亡过程中的作用。结果 与对照组细胞相比, ACBD3 敲低组细胞 ROS 水平增高, 细胞内总铁含量降低 ($P < 0.001$), 但细胞中 Fe^{2+} 浓度增加明显 ($P < 0.001$)。在铁死亡诱导剂 RSL3 处理条件下, ACBD3 敲低组细胞活力降低 ($P < 0.001$), 细胞脂质过氧化水平提高 ($P < 0.001$)。结论 敲低 ACBD3 改变了哺乳动物细胞内铁稳态, 促进细胞铁死亡。

关键词 ACBD3; 铁离子稳态; 铁死亡

中图分类号 Q 255

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1341-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.016

铁死亡是一种可调控细胞死亡形式, 与发育、衰老、免疫和癌症等生理病理过程密切相关^[1]。铁死亡是由组成细胞膜的多不饱和脂肪酸在铁离子和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的作用下生成脂质过氧化物, 这种脂质过氧化物的积累将破坏细胞膜的完整性, 进而导致铁死亡的发生。因此, 铁死亡是脂质过氧化反应驱动, 细胞内氧化还原稳态失衡的结果^[2]。迄今为止, 文献中报道的诱导细胞发生铁死亡的方式包括: 抑制抗氧化系统 X_{C^-} ; 抑制/降解/失活谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4); 消耗还原型辅酶 Q10; 过氧化物、铁或多不饱和脂肪酸过载等方式^[2]。铁死亡除了可导致细胞死亡外, 在一定程度上还可以消除机体内癌细胞、炎症细胞或活化的成纤维细胞, 因此, 阐明铁死亡发生的分子机制具有重要意义^[3]。

ACBD3 是一个含有酰基辅酶 A 结合结构域的高尔基体蛋白, 又名 PAP7 或 GCP60, 在进化上非常

保守, 广泛表达于人体多种组织。ACBD3 在细胞内参与多种生理病理过程, 如类固醇合成、脂代谢、高尔基体形态维持、葡糖神经酰胺运输、病毒入侵、细菌增殖以及肿瘤发生发展等^[4]。此外, ACBD3 亦可通过与铁离子转运蛋白 DMT1 相互作用维持细胞内铁稳态^[5]。铁离子过载可导致铁死亡的发生, 而 ACBD3 蛋白又参与铁稳态的调控。该研究通过 RNA 干扰技术降低细胞内 ACBD3 表达水平, 研究其在细胞铁死亡过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HeLa 细胞和 HEK293 细胞购自中国科学院细胞库(上海); 胎牛血清、DMEM 培养基、青链霉素、胰蛋白酶-EDTA、嘌呤霉素及 Lipofectamin 2000 购自美国 ThermoFisher 公司; ACBD3 和 β -actin 抗体购自武汉 Proteintech 公司; 铁含量检测试剂 FerroOrange(F374)和 Calcein-AM(C326)和耐光型 ROS 探针(R253)购自上海同仁化学公司; 铁死亡诱导剂 RSL3 购自美国 MCE 公司; 细胞活力测量试剂盒(g7570)购自美国 Promega 公司; 脂质过氧化检测试剂 BODIPY 581/591 C11 购自美国 Invitrogen 公司; 化学发光成像系统购自上海天能公司; 激光扫描共聚焦显微镜 LSM800 购自德国蔡司公司; 酶标仪(Spark)购自瑞士帝肯公司。

1.2 细胞培养 HeLa 细胞和 HEK293 细胞培养在含 10% FBS 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的青链霉素的 DMEM 培养基中, 设定培养温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 含量为 5%。

1.3 构建 ACBD3 敲低细胞株 根据标准设计程序, 寻找两条长度为 21 bp 的人源 ACBD3 最优靶序列 5'-GCAAAGCATTTCATCCAACCTT-3' 和 5'-CCCAGCTCATAGGTGTTCTATA-3'。根据载体 pLKO.1 puro(Addgene#8453)双酶切位点来为靶标序列添加酶切接头, 然后按照标准的分子克隆方法, 将寡核苷酸退火后克隆到载体 pLKO.1 puro。进一步将测序正确的质粒与慢病毒包装质粒 pMD2.G(Addgene # 12259)以及 psPax2(Addgene# 12260)一起共转到 HEK293 细胞, 48 h 后收集病毒上清液, 用来感染密度为 30% ~ 50% 的 HeLa 细胞, 感染 48 h 后用浓度

2023-05-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 91854120)

作者单位: 安徽医科大学生命科学学院, 合肥 230032

作者简介: 邱 荣, 女, 硕士研究生;

曹新旺, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caoxw@ahmu.edu.cn

为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的嘌呤霉素进行筛选, 最终得到 ACBD3 敲低的稳定细胞株。ACBD3-shRNA1: (F) C CGGGCAAAGCATTTCATCCAACCTCTCGAGAACGTTG GATGAAATGCTTGCTTTTG; (R) AATTCAAAAG CAAAGCATTTCATCCAACCTCTCGAGAACGTTGGATG AAATGCTTG; ACBD3-shRNA2: (F) CCGGCCAT GAAGAAGGATCATATCCTCGAGGATATGATCCTTCT TCATGGGTTTG, (R) AATTCAA-AACCCATGAA GAAGGATCATATCCTCGAGGATATGATCCTTCTCA TGGG。

将以上细胞分别分为 3 组: 野生型 HeLa 细胞为对照组; 使用 shRNA1 序列的敲低细胞为 ACBD3 sh1 组; 使用 shRNA2 序列的敲低细胞为 ACBD3 sh2 组。

1.4 Western blot 检测 将 3 组细胞分别用 PBS 洗 1 次, 然后用含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 (pH 7.4 的 50 mmol/L Hepes, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100) 在冰上裂解 30 min, 接着进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到 PVDF 膜上, 用相应的一抗和二抗进行孵育, 将 PVDF 膜放在化学发光成像系统中成像, 检测目标蛋白条带。

1.5 细胞活力测定 在 96 孔板中分别接种 3 组细胞 (密度为 6×10^4 个/ml), 培养过夜。第 2 天按照 40、16、6.4、2.56、1.024 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 共 5 个浓度梯度加入 RSL3, 培养 24 h 后, 除去培养基, 加入 50 μl 不含 FBS 的 DMEM, 再加入 50 μl CellTiter-Glo 工作液, 避光混匀 5 min 后, 静置 5 min, 然后用酶标仪测定化学发光值。

1.6 细胞 ROS 检测 在 96 孔板中接种 3 组细胞 (密度为 1×10^5 个/ml), 培养过夜, 次日除去培养基, 用 HBSS 清洗 2 次, 加入高度敏感的 DCFH-DA 染料工作液, 在培养箱培养 30 min 后, 移去工作液, 用 HBSS 清洗 2 次, 再加入 HBSS, 然后用倒置荧光显微镜观察。

1.7 细胞中脂质过氧化物检测 将密度为 1×10^5 细胞/ml 的 3 组细胞接种于 96 孔板中, 培养过夜, 根据实验设计进一步分成 6 组, 分别为野生型细胞、ACBD3 sh1、ACBD3 sh2、野生型细胞 + RSL3、ACBD3 sh1 + RSL3、ACBD3 sh2 + RSL3。次日除去培养基, 加入或不加入 DMEM 培养基稀释的 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ RSL3 溶液, 培养 1 h 后, 清洗细胞 2 次, 添加 BODIPY 581/591 C11 工作液, 在培养箱内培养 30 min 后移去培养基, 用 HBSS 清洗细胞 2 次后, 再次加入 HBSS, 用激光共聚焦显微镜成像。

1.8 细胞游离 Fe^{2+} 含量测定 接种 3 组细胞于 96 孔板中, 在培养箱中培养过夜, 第 2 天先弃去培养基, 再用 HBSS 溶液洗涤细胞 3 次, 然后加入浓度为 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 FerroOrange 工作液, 在培养箱中培养 30 min 后, 无需清洗, 直接用荧光显微镜下对细胞进行观察。

1.9 测定细胞内总铁含量 在 96 孔板中接种 3 组细胞, 培养箱中过夜培养, 第 2 天, 移去培养基, 用 PBS 清洗细胞 2~3 次, 每孔加入 100 μl 浓度为 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Calcein-AM 溶液, 在培养箱培养 15~30 min 后弃去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 后加入 HBSS 溶液, 用荧光显微镜观察细胞。

1.10 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有实验均独立重复进行 3 次, 采用 GraphPad Prism 8.0 进行独立样本 *t* 检验分析和作图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ABCD3 敲低对铁死亡诱导剂 RSL3 作用下细胞活力的影响 Western blot 分析显示, 与对照组细胞相比, 用两种含有不同 ACBD3 shRNA 病毒处理的细胞中 ACBD3 表达水平降低 ($P < 0.001$)。细胞活力分析实验显示, 与野生型细胞 (对照组) 相比, ACBD3 敲低组细胞对铁死亡诱导剂 RSL3 更为敏感, 在 RSL3 浓度为 2.56 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时细胞活力即已下降了 90%, 细胞活力降低 ($F = 32.231$, $P < 0.001$); 而野生型细胞在 RSL3 浓度达到 16 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时细胞活力才明显下降 ($P < 0.001$)。两个 ACBD3 敲低组细胞在不同 RSL3 浓度下的细胞活力无明显差异。见图 1。

2.2 ACBD3 敲低对细胞脂质过氧化水平的影响 在野生型细胞和 ACBD3 敲低组细胞中, 分别不加入或加入 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ RSL3, 然后利用 BODIPY 581/591 C11 检测细胞脂质过氧化。BODIPY 581/591 C11 探针分子通过与脂质过氧化时产生的脂质自由基反应检测细胞脂质过氧化水平。未发生反应的探针发出红色荧光, 而发生反应后的探针由红色变为绿色, 因此, 可以利用相对荧光强度 (绿色/红色) 来表征细胞内脂质过氧化水平改变。结果显示, 与野生型细胞相比, ACBD3 敲低组细胞脂质过氧化增加 ($F = 25.261$, $P < 0.001$)。RSL3 处理后, 相应组细胞相对荧光强度增强 ($F = 30.337$, $P < 0.001$); 与野生型细胞相比, ACBD3 敲低组细胞的脂质过氧化水平

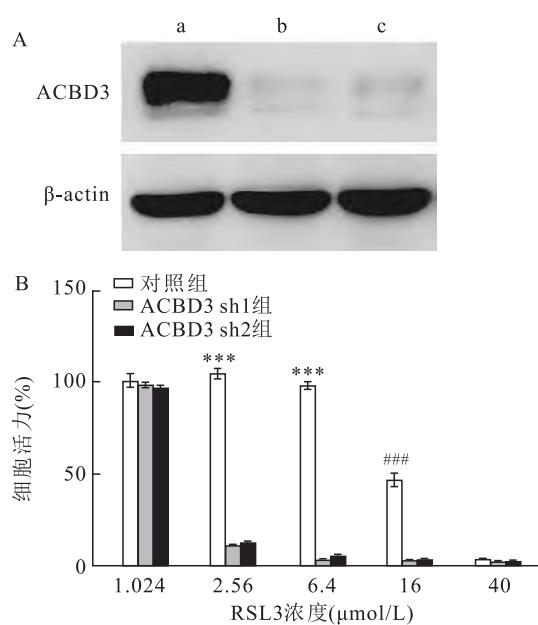


图1 RSL3作用下野生型细胞和ACBD3敲低组细胞细胞活力比较
A: Western blot检测对照组和ACBD3敲低组细胞中ACBD3的表达水平; a:对照组; b:ACBD3 sh1组; c:ACBD3 sh2组; B:不同给药浓度下的细胞活力;与RSL3同一给药浓度敲低组比较: ***P < 0.001;与6.4 μmol/L RSL3浓度下的对照组比较: #P < 0.001

增加($F = 28.732, P < 0.001$)。两不同ACBD3敲低组细胞在RSL3不存在或存在条件下脂质过氧化

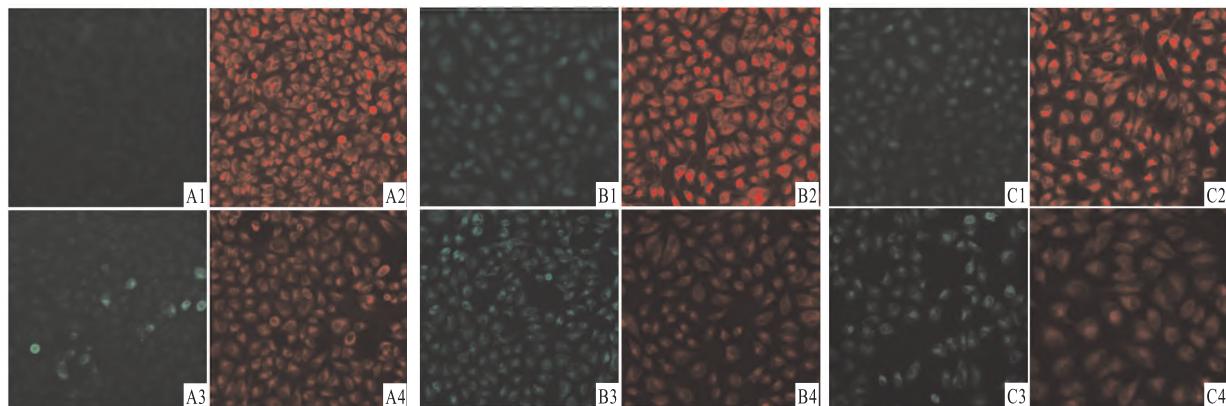


图2 BODIPY 581/591 C11标记野生型细胞和敲低组细胞脂质过氧化水平比较

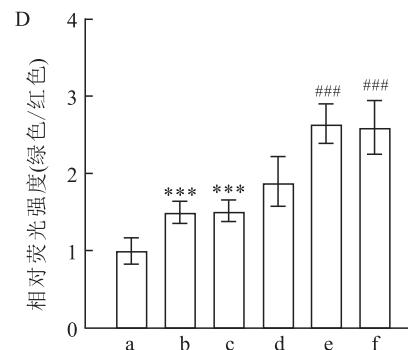
A~C:野生型细胞、ACBD3 sh1细胞、ACBD3 sh2细胞的荧光图像 $\times 40$;1:未使用RSL3处理的绿色荧光图像;2:未使用RSL3处理的红色荧光图像;3:RSL3处理的绿色荧光图像;4:RSL3处理的红色荧光图像;D:各组细胞相对荧光强度统计学分析;a:野生型细胞;b:ACBD3 sh1;c:ACBD3 sh2;d:野生型细胞+RSL3;e:ACBD3 sh1+RSL3;f:ACBD3 sh2+RSL3;与野生型细胞比较: ***P < 0.001;与野生型细胞+RSL3比较: #P < 0.001

水平无明显差异。见图2。

2.3 ACBD3敲低对细胞内ROS浓度的影响 利用耐光性ROS探针检测野生型细胞和ACBD3敲低组细胞ROS水平。结果表明,与野生型细胞相比,ACBD3敲低组细胞中ROS水平升高($F = 33.261, P < 0.001$),而两个ACBD3敲低组细胞ROS浓度无明显差异。见图3。

2.4 ACBD3敲低对细胞内总铁含量和 Fe^{2+} 水平的影响 利用荧光探针Calcein-AM测量细胞中的总铁含量,该探针螯合细胞中铁离子后其荧光将会淬灭。因此,Calcein-AM标记细胞的荧光强度与细胞中总铁含量呈负相关。测量结果表明,与对照组比较,ACBD3敲低组细胞荧光强度增强($F = 19.205, P < 0.001$),但两个ACBD3敲低组细胞间荧光强度差异无统计学意义。因此,与对照组细胞相比,ACBD3敲低组细胞内总铁含量明显下降。

利用FerroOrange探针检测细胞内 Fe^{2+} 浓度,该探针结合细胞内 Fe^{2+} 后荧光强度会随铁离子浓度增加。结果显示,与对照组细胞相比,ACBD3敲低组细胞中荧光强度增强($F = 26.379, P < 0.001$),但两个ACBD3敲低组细胞间荧光强度差异无统计学意义。因此,与对照组细胞相比,ACBD3敲低组细胞 Fe^{2+} 浓度升高。见图4。



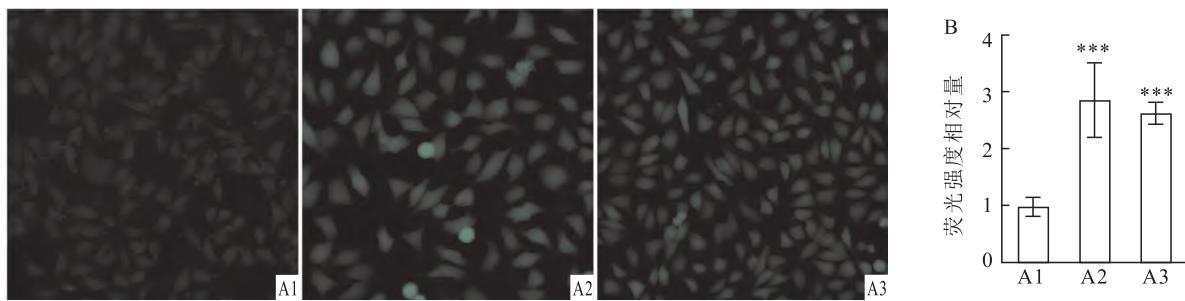
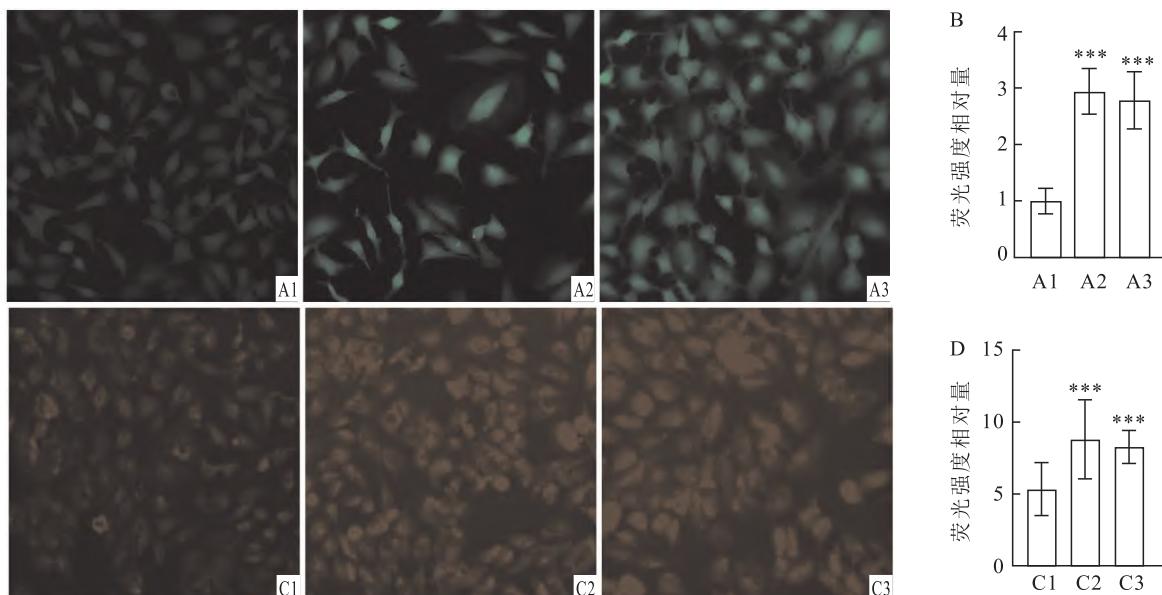


图3 ROS探针标记野生型细胞和ACBD3敲低组细胞ROS水平比较

A: ROS探针标记野生型细胞和ACBD3敲低组细胞 $\times 40$;B:各组细胞荧光强度统计学分析;1:对照组;2:ACBD3 sh1组;3:ACBD3 sh2组;与对照组比较:*** $P < 0.001$

图4 野生型细胞与ACBD3敲低组细胞内总铁含量和Fe²⁺水平比较

A:Calcein-AM探针标记对照组和ACBD3敲低组细胞 $\times 40$;B:各组细胞内总铁含量统计学分析;C:FerroOrange探针标记对照组和ACBD3敲低组细胞 $\times 40$;D:各组细胞内Fe²⁺含量统计学分析;1:对照组;2:ACBD3 sh1组;3:ACBD3 sh2组;与对照组比较:*** $P < 0.001$

3 讨论

铁死亡是一种铁依赖的细胞膜氧化损伤进而引发的调节性细胞死亡,与细胞凋亡、坏死和细胞自噬存在较大区别^[6]。近年来,多项研究^[7-8]表明,铁死亡在肿瘤抑制以及某些癌症治疗过程中发挥重要作用,因此,靶向诱导铁死亡已成为肿瘤研究热点之一。

细胞膜中含有大量磷脂分子,它们由单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸组成。在ROS和铁离子存在的条件下,多不饱和脂肪酸可被氧化产生脂质过氧化物,从而引起细胞膜破损,导致细胞铁死亡^[11]。在生理条件下,细胞可利用自身的抗氧化系统进行调控,避免细胞膜损伤。因此,测定脂质过氧

化物是研究细胞铁死亡的一个重要标准。本研究中,ACBD3敲低组细胞显著增加了对铁死亡诱导剂RSL3的敏感性,在RSL3浓度为2.56 μmol/L时细胞活力显著下降。进一步实验结果表明,ACBD3敲低可使细胞内ROS水平提高、脂质过氧化水平明显增加。

维持细胞铁稳态是细胞进行正常生理功能的必要条件,破坏铁稳态将导致机体发生多种病变^[9]。例如,铁过载引发的铁死亡在多种心血管疾病发展过程中有重要作用^[10]。Cheah et al^[5]报道,ACBD3可与铁离子转运蛋白DMT1相互作用,它们与Ras超家族G蛋白Dexras1一起,维持细胞内铁离子稳态。铁离子的存在是发生铁死亡不可或缺的条件。实验结果表明,ACBD3敲低导致的细胞内Fe²⁺浓度

显著提高,进一步证实敲低 ACBD3 促进了细胞铁死亡过程,但是,ACBD3 敲低导致的细胞内 Fe^{2+} 浓度升高的分子机制仍需进一步研究。

ACBD3 在亨廷顿舞蹈症等神经退行性疾病患者以及乳腺癌等肿瘤患者中表达量均显著上调^[11-12]。神经退行性疾病患者的中枢神经系统及周围神经系统的特定区域可发生明显的细胞铁死亡现象。铁死亡在肿瘤的放射治疗过程中亦具有重要作用^[13]。因此,阐明 ACBD3 在铁死亡过程中的作用机制,合理干预细胞铁死亡进程,可为相关疾病的诊疗提供重要解决方案。

参考文献

- [1] Stockwell B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401-21.
- [2] Jiang X, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-82.
- [3] Stockwell B R, Jiang X. A physiological function for ferroptosis in tumor suppression by the immune system[J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 14-5.
- [4] Fan J, Liu J, Culty M, et al. Acyl-coenzyme a binding domain containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): an emerging signaling molecule[J]. *Prog Lipid Res*, 2010, 49(3): 218-34.
- [5] Cheah J H, Kim S F, Hester L D, et al. NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexras1[J]. *Neuron*, 2006, 51(4): 431-40.
- [6] Green D R. The coming decade of cell death research: five riddles[J]. *Cell*, 2019, 177(5): 1094-107.
- [7] Angeli J P F, Shah R, Pratt D A, et al. Ferroptosis inhibition: mechanisms and opportunities[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(5): 489-98.
- [8] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-96.
- [9] Chen G Q, Bentham F A, Wu J, et al. Artemisinin compounds sensitize cancer cells to ferroptosis by regulating iron homeostasis[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(1): 242-54.
- [10] Fang X, Ardehali H, Min J, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20(1): 7-23.
- [11] Shbodio J I, Paul B D, Machamer C E, et al. Golgi protein ACBD3 mediates neurotoxicity associated with Huntington's disease[J]. *Cell Rep*, 2013, 4(5): 890-7.
- [12] Yue X, Qian Y, Gim B, et al. Acyl-CoA-binding domain-containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): a multi-functional membrane domain organizer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 2028.
- [13] Lei G, Mao C, Yan Y, et al. Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(11): 836-57.

Effect of ACBD3 knockdown on ferroptosis in mammalian cells

Qiu Rong, Ma Shanchuan, Qian Ying, Cao Xinwang

(School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To explore the role of Golgi protein ACBD3 knockdown in ferroptosis. **Methods** ACBD3 knockdown via shRNA, combined with treatment of ferroptosis inducer RSL3, cell viability, iron levels, reactive oxygen species (ROS) levels, and lipid peroxide levels in different treatment groups were measured to comprehensively analyze the role of ACBD3 in ferroptosis. **Results** Compared to control cells, the levels of ROS increased in ACBD3 knockdown cells. The total iron content was significantly reduced ($P < 0.001$), while the Fe^{2+} concentration in ACBD3 knockdown cells increased compared to control cells ($P < 0.001$). In the presence of ferroptosis inducer RSL3, compared to control cells, cell viability significantly decreased ($P < 0.001$), and lipid peroxide greatly increased in ACBD3 knockdown cells ($P < 0.001$). **Conclusion** Golgi protein ACBD3 knockdown in mammalian cells changes iron homeostasis and promotes ferroptosis.

Key words ACBD3; iron homeostasis; ferroptosis