

褪黑素通过诱导铁死亡抑制食管鳞癌生长的机制研究

李敏¹, 杨素清², 王伟^{2*}, 李洪峰¹, 张慧欣³

1. 冀中能源峰峰集团有限公司总医院 骨科, 河北 邯郸 056201

2. 邯郸市第一医院 胸外科, 河北 邯郸 056000

3. 冀中能源峰峰集团有限公司总医院 消化科, 河北 邯郸 056201

摘要: **目的** 探讨褪黑素通过抑制溶质运载蛋白 7 家族成员 11 (SLC7A11) 表达对食管鳞癌细胞铁死亡的影响。**方法** 使用不同浓度 (0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mmol/L) 的褪黑素处理人食管鳞癌 KYSE150 细胞, 筛选建立 KYSE150 细胞铁死亡模型的褪黑素浓度; 将 KYSE150 细胞分为对照组、褪黑素 (1.0 mmol/L) 组、褪黑素 (1.0 mmol/L) + pcDNA (转染空载质粒) 组、褪黑素 (1.0 mmol/L) + SLC7A11 (转染 SLC7A11 过表达质粒) 组。透射电子显微镜观察 KYSE150 细胞线粒体形态; 碘化丙啶 (PI) 染色检测细胞死亡; 试剂盒检测细胞 Fe^{2+} 、谷胱甘肽 (GSH) 及活性氧 (ROS) 水平; Western blotting 法检测细胞 SLC7A11 蛋白表达。建立食管鳞癌裸鼠荷瘤模型, 将 BALB/c 裸鼠分为模型组、褪黑素 (ip 25 mg/kg 褪黑素) 组、褪黑素 + pcDNA (ip 25 mg/kg 褪黑素 + 裸鼠右侧腋下注射转染空载质粒的 KYSE150 细胞) 组、褪黑素 + SLC7A11 (ip 25 mg/kg 褪黑素 + 裸鼠右侧腋下注射转染 SLC7A11 过表达质粒的 KYSE150 细胞) 组; 分别检测各组小鼠肿瘤体积、质量及肿瘤组织中 SLC7A11 蛋白表达。**结果** 1.0 mmol/L 褪黑素可诱导 KYSE150 细胞铁死亡; 与对照组比较, 褪黑素组 KYSE150 细胞死亡数目增多, 细胞内的线粒体变小, 线粒体膜密度增加, 细胞内 Fe^{2+} 及 ROS 水平显著增加 ($P < 0.05$), SLC7A11 蛋白表达水平及细胞内 GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与褪黑素 + pcDNA 组比较, 褪黑素 + SLC7A11 组细胞死亡数目减少, 细胞内的线粒体增大, 线粒体膜密度减少, 细胞内 Fe^{2+} 及 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$), SLC7A11 蛋白表达水平及细胞内 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$); 褪黑素可通过抑制 SLC7A11 蛋白表达抑制食管鳞癌裸鼠肿瘤生长。**结论** 褪黑素可能通过抑制 SLC7A11 表达诱导细胞铁死亡, 抑制食管鳞癌细胞生长。

关键词: 褪黑素; 食管鳞癌; 铁死亡; 溶质运载蛋白 7 家族成员 11; 谷胱甘肽; 活性氧

中图分类号: R966; R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2023)07 - 1560 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.07.002

Mechanism of melatonin inhibiting the growth of esophageal squamous cell carcinoma by inducing iron death

LI Min¹, YANG Su-qing², WANG Wei², LI Hong-feng¹, ZHANG Hui-xin³

1. Department of Orthopaedics, General Hospital of Jizhong Energy Fengfeng Group Co., Ltd., Handan 056201, China

2. Department of Thoracic Surgery, The First Hospital of Handan City, Handan 056000, China

3. Department of Digestive, General Hospital of Jizhong Energy Fengfeng Group Co., Ltd., Handan 056201, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of melatonin on ferroptosis of esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting the expression of solute carrier protein 7 family member 11 (SLC7A11). **Methods** The KYSE150 cells were treated with different concentrations of melatonin (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mmol/L), and the concentrations of melatonin were screened to establish the iron death model of KYSE150 cells. KYSE150 cells were divided into control group, melatonin (1.0 mmol/L) group, melatonin (1.0 mmol/L) + pcDNA (transfected with empty plasmid) group, and melatonin (1.0 mmol/L) + SLC7A11 (transfected with SLC7A11 overexpression plasmid) group. Mitochondrial morphology of KYSE150 cells was observed by transmission electron microscope. The cell death was detected by propyl iodide (PI) staining. The levels of Fe^{2+} , glutathione (GSH), and reactive oxygen species (ROS) were detected by the kit. The expression of SLC7A11 protein was detected by Western blotting. Establishing a tumor bearing model of

收稿日期: 2023-03-07

基金项目: 河北省卫生和计划生育委员会科研基金项目 (20220981)

作者简介: 李敏, 女, 本科, 副主任医师, 研究方向为临床护理。E-mail: wangtao78716@163.com

*通信作者: 王伟, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为临床医学 (胸外科)。E-mail: faconry@126.com

esophageal squamous cell carcinoma in nude mice. BALB/c nude mice were divided into model group, melatonin (ip 25mg/kg melatonin) group, melatonin + pcDNA (ip 25mg/kg melatonin + KYSE150 cells transfected with empty plasmids injected into the right armpit of nude mice) group, and melatonin + SLC7A11 (ip 25mg/kg melatonin + KYSE150 cells transfected with SLC7A11 overexpression plasmid by right armpit injection of nude mice) group. Tumor volume, mass and expression of SLC7A11 protein in tumor tissues were detected. **Results** 1.0 mmol/L melatonin was able to induce ferroptosis of KYSE150 cells. Compared with control group, the death number of KYSE150 cells in melatonin group increased, intracellular mitochondria became smaller, mitochondrial membrane density increased, intracellular Fe^{2+} and ROS levels were significantly increased ($P < 0.05$), SLC7A11 protein expression level and intracellular GSH level were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with melatonin + pcDNA group, the number of cell death in melatonin + SLC7A11 group was decreased, intracellular mitochondria were increased, mitochondrial membrane density was decreased, intracellular Fe^{2+} and ROS levels were significantly decreased ($P < 0.05$), SLC7A11 protein expression level and intracellular GSH level were significantly increased ($P < 0.05$). Melatonin can inhibit the tumor growth of nude mice with esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting SLC7A11 protein expression. **Conclusion** Melatonin may induce cell ferroptosis and inhibit the growth of esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting the expression of SLC7A11.

Key words: melatonin; esophageal squamous cell carcinoma; ferroptosis; SLC7A11; GSH; ROS

食管癌是常见消化系统恶性肿瘤，其主要组织病理学以食管鳞癌为主，发病率与死亡率较高，目前食管鳞癌的治疗方式以手术联合放化疗为主，由于肿瘤耐药性，患者 5 年生存率很低，寻找新的治疗药物是提高患者生存率的重要途径^[1-2]。铁死亡是细胞内铁依赖的脂质过氧化损伤导致的非凋亡性死亡，研究显示，铁死亡与肿瘤的发生发展密切相关^[3]。褪黑素是由松果体分泌的吲哚类物质，具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节的作用，研究显示，褪黑素可抑制胃癌^[4]、卵巢癌^[5]等肿瘤细胞的增殖与迁移，促进肿瘤细胞的凋亡，且在食管癌中，褪黑素可协同 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 抑制食管癌细胞迁移与侵袭，促进细胞凋亡，提高 5-FU 对食管癌细胞的敏感性^[6]。溶质运载蛋白 7 家族成员 11 (SLC7A11) 是调节铁死亡的蛋白酶，在维持细胞内外的谷胱甘肽氧化还原平衡中发挥重要作用，SLC7A11 过表达可抑制铁死亡，与胃癌、乳腺癌等肿瘤的发展密切相关^[7-8]。研究显示，SLC7A11 在食管鳞癌组织中表达水平升高，与食管鳞癌的临床分期、有无淋巴结转移、及分化程度、患者预后及新辅助化疗耐药有关^[9]。因此，本研究通过探究褪黑素对食管鳞癌细胞铁死亡及对 SLC7A11 表达的影响，旨在揭示褪黑素调控食管鳞癌细胞铁死亡的作用机制，为食管鳞癌的分子靶向治疗提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞与动物

人食管鳞癌 KYSE150 细胞购自中国科学院上海细胞库。5~6 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠，体质量 16~20 g，购自武汉大学动物实验中心[生产许可证号 SCXK (鄂) 2019-0004]。所有实验按照《实

验动物护理和使用指南》执行，均经过冀中能源峰峰集团有限公司总医院批准 (动物实验伦理批号 2022019)。

1.2 主要试剂与仪器

褪黑素 (质量分数 $\geq 98\%$ ，货号 M5250)、碘化丙啶 (PI，规格 10 mg，货号 P4170)、铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1，规格 5 mg，货号 SML0583)、铁含量检测试剂盒 (货号 MAK025) 购自 Sigma 公司；DMEM 培养基 (货号 10566016) 购自美国 Gibco 公司；SLC7A11 过表达质粒及空载质粒 (pcDNA) 购自广州锐博生物科技有限公司；MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (货号 E-CK-A341)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 E-BC-K318-M) 购自 Elabscience 公司；RIPA 裂解液 (货号 R0010) 购自北京索莱宝生物科技有限公司；兔抗人 SLC7A11 (货号 ab175186)、 β -actin (货号 ab8227) 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (货号 ab205718) 购自 Abcam 公司；总谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒 (货号 S0052)、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (货号 S0033S) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

JEM-1230 透射电子显微镜购自日本电子公司；FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司；Flexstation-3 多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司。

2 方法

2.1 铁死亡细胞模型的建立

KYSE150 细胞接种至 DMEM 培养基常规培养，培养至对数期时，以每孔 4×10^3 个细胞接种至 96 孔板中，分别使用浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、

4.0 mmol/L 的褪黑素处理 KYSE150 细胞 24 h, 并单独设置空白组, MTT 检测细胞存活率。

另选择对数生长期的 KYSE150 细胞, 使用 1.0 mmol/L 褪黑素处理 KYSE150 细胞为褪黑素组; 另设置褪黑素+Fer-1 组, 使用 5 μ mol/L Fer-1^[10]与 1.0 mmol/L 褪黑素共同处理 KYSE150 细胞。褪黑素组、褪黑素+Fer-1 组处理 24 h, MTT 检测细胞活性[490 nm 处吸光度 (A_{490}) 值]。

2.2 细胞分组

将 KYSE150 细胞分成 4 组, 分别为对照组、褪黑素组、褪黑素+pcDNA 组、褪黑素+SLC7A11 组。褪黑素组使用 1.0 mmol/L 褪黑素处理 24 h, 褪黑素+pcDNA (转染空载质粒) 组、褪黑素+SLC7A11 (转染 SLC7A11 过表达质粒) 组先进行质粒转染, 转染 24 h 后, 使用 1.0 mmol/L 褪黑素处理 24 h, 每组设置 6 个复孔。

2.3 细胞线粒体形态观察

离心收集各组处理的细胞, PBS 洗涤后, 使用 2.5%戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, 加入 1%锇酸放置 1 h, PBS 洗涤 3 次, 分别使用 50%、70%、90%乙醇及丙酮脱水, 包埋固化后, 切成 50~60 nm 的切片, 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 透射电子显微镜观察并拍照。

2.4 PI 染色检测细胞死亡

将各组处理后的细胞 1 500 r/min 离心 5 min, 收集细胞, PBS 洗涤, 加入 70%乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min, PBS 洗涤, 加入 500 μ L PI (50 μ g/mL) 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞死亡。

2.5 细胞内 Fe^{2+} 及 GSH 水平检测

离心收集各组处理的细胞, PBS 洗涤后加入 RIPA 裂解液裂解 2 h 后, 分别使用铁含量检测试剂盒及总 GSH 检测试剂盒检测细胞中 Fe^{2+} 及 GSH 的水平。

2.6 细胞中 ROS 的检测

离心收集各组处理的细胞, PBS 洗涤后加入 10 μ mol/L DCFH-DA, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 去除多余的液体, 荧光酶标仪 (488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长) 检测荧光强度, 荧光越强则表示 ROS 的含量越高。

2.7 Western blotting 法检测 SLC7A11 蛋白表达

离心收集细胞 PBS 洗涤 2 遍, 加入 RIPA 裂解液裂解, 超声破碎 3 min, 12 000 r/min 离心 20 min 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量, 每组取 25 μ g

蛋白煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 转至 PVDF 膜后 5%的脱脂牛奶封闭, 加入兔抗人 SLC7A11 和 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 1 h, ECL 显色液显色, 以 β -actin 为内参, Image J 软件分析目的蛋白相对表达量。

2.8 裸鼠荷瘤实验

将 BALB/c 裸鼠分为模型组、褪黑素组、褪黑素+pcDNA 组、褪黑素+SLC7A11 组, 每组各 10 只。KYSE150 细胞使用 PBS 调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 模型组与褪黑素组在无菌条件下, 在裸鼠右侧腋下注射 100 μ L 细胞液, 褪黑素+pcDNA 组、褪黑素+SLC7A11 组按照同样方法在裸鼠右侧腋下注射 100 μ L 分别转染过空载质粒 (pcDNA) 和 SLC7A11 过表达质粒 (SLC7A11) 的 KYSE150 细胞, 接种第 8 天, 褪黑素组、褪黑素+pcDNA 组、褪黑素+SLC7A11 组小鼠 ip 给药 25 mg/kg, 2 d 给药 1 次, 给药剂量参考文献报道^[6], 第 23 天脱颈处死小鼠, 取肿瘤组织, 测量体积并称质量, 免疫组化法检测肿瘤组织 SLC7A11 蛋白表达。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 25.0 进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行多组间比较, t 检验用于两组间比较。

3 结果

3.1 褪黑素诱导 KYSE150 细胞铁死亡模型的建立

结果显示, 不同浓度的褪黑素均可显著降低 KYSE150 细胞增殖活性, 当褪黑素浓度为 1.0 mmol/L 时, 细胞存活率约 70%, 因此选用 1.0 mmol/L 的褪黑素用于后续实验, 见图 1A。

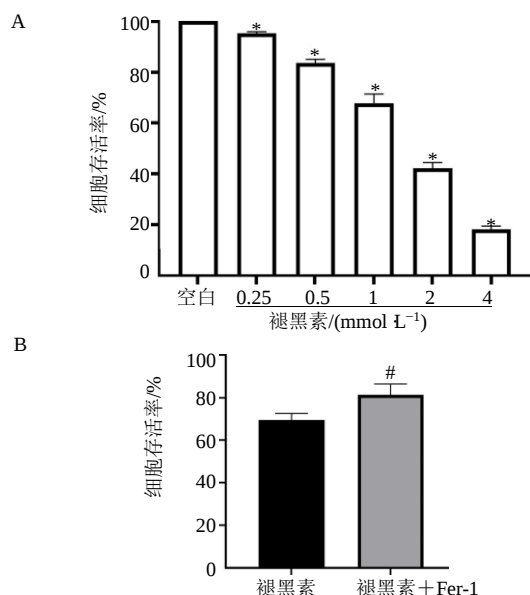
为验证褪黑素通过铁死亡诱导 KYSE150 细胞死亡, 使用 1.0 mmol/L 褪黑素与 Fer-1 共同处理 KYSE150 细胞。结果显示, 与褪黑素组比较, 褪黑素+Fer-1 组 KYSE150 细胞增殖活性显著升高, 表明 Fer-1 可逆转褪黑素对 KYSE150 细胞的增殖抑制作用, 见图 1B。

3.2 褪黑素对 KYSE150 细胞形态的影响

如图 2 所示, 透射电子显微镜观察细胞形态, 褪黑素组细胞内的线粒体较对照组变小, 线粒体膜密度增加; 褪黑素+SLC7A11 组细胞线粒体较褪黑素+pcDNA 组正常, 线粒体膜密度减少。

3.3 褪黑素对 KYSE150 细胞死亡的影响

如图 3 所示, 死亡细胞的细胞核被 PI 染成红



与空白组比较: * $P < 0.05$; 与褪黑素组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs melatonin 0 mmol L⁻¹ group; # $P < 0.05$ vs melatonin group

图 1 不同浓度褪黑素对 KYSE150 细胞存活率 (A) 和褪黑素对铁死亡细胞模型 (B) 的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of melatonin on KYSE150 cell survival (A) and on iron-dead cell models (B)

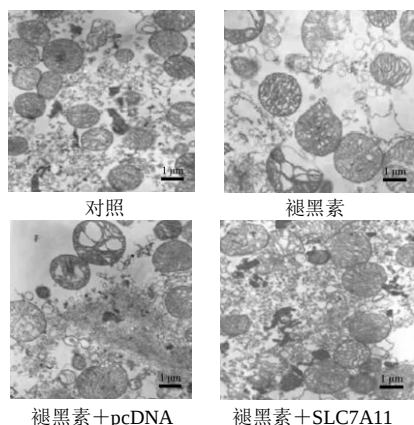


图 2 透射电子显微镜观察细胞形态 (×50 000)

Fig. 2 Cell morphology observed by transmission electron microscope (×50 000)

色, 褪黑素组 KYSE150 死亡细胞数较对照组增多, 褪黑素 + SLC7A11 组死亡细胞数较褪黑素 + pcDNA 组减少。

3.4 褪黑素对 KYSE150 细胞内 Fe²⁺ 水平的影响

与对照组比较, 褪黑素组 KYSE150 细胞内 Fe²⁺ 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与褪黑素 + pcDNA 组比较, 褪黑素 + SLC7A11 组细胞内 Fe²⁺ 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.5 褪黑素对 KYSE150 细胞内 ROS、GSH 水平的影响

与对照组比较, 褪黑素组 KYSE150 细胞内 GSH 水平显著降低, ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$), DCF 荧光强度增加; 与褪黑素 + pcDNA 组比较, 褪黑素 + SLC7A11 组细胞内 GSH 水平显著升高, ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$), DCF 荧光强度降低, 见图 4、表 2。

3.6 褪黑素对 KYSE150 细胞 SLC7A11 表达的影响

Western Blotting 结果显示, 与对照组比较, 褪黑素组 KYSE150 细胞 SLC7A11 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与褪黑素 + pcDNA 组比较, 褪黑素 + SLC7A11 组细胞 SLC7A11 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 见图 5、表 3。

3.7 褪黑素对荷瘤小鼠肿瘤体积与质量的影响

与对照组比较, 褪黑素组肿瘤质量与体积显著降低 ($P < 0.05$); 与褪黑素 + pcDNA 组比较, 褪黑素 + SLC7A11 组肿瘤质量与体积显著降低显著升高 ($P < 0.05$), 见表 4。

3.8 褪黑素对荷瘤小鼠肿瘤组织 SLC7A11 表达的影响

免疫组化结果显示, 对照组肿瘤组织褐色或中褐色细胞较多, SLC7A11 呈强阳性表达, 褪黑素组与褪黑素 + pcDNA 组细胞 SLC7A11 阳性颗粒表达较对照组减少, 褪黑素 + SLC7A11 组细胞 SLC7A11 阳性颗粒表达较褪黑素 + pcDNA 组增多, 见图 6。

4 讨论

褪黑素是一种吲哚类神经内分泌激素, 在多种人类肿瘤中具有抗肿瘤的作用, 通过诱导细胞周期阻滞, 抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡和调节免疫等多种途径发挥抗癌作用^[11]。为验证褪黑素对食管鳞癌的抑制作用, 本研究建立食管鳞癌细胞裸鼠移植瘤模, ip 一定的褪黑素治疗后, 结果显示, 褪黑素可显著抑制食管鳞癌细胞裸鼠移植瘤的生长。除抗肿瘤作用, 褪黑素还可增加肿瘤细胞对紫杉醇、多柔比星等化疗药物敏感性^[12]。另有研究显示, 褪黑素通过激活核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) /血红素加氧酶-1 (HO-1) 信号通路抑制高葡萄糖诱导 2 型糖尿病骨质疏松症的铁死亡^[13]。铁死亡是一种依赖性的脂质过氧化物介导的细胞死亡方式, 与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[14]。褪黑素对食管鳞癌细胞铁死亡的影响尚不清楚, 本研究结果显示,

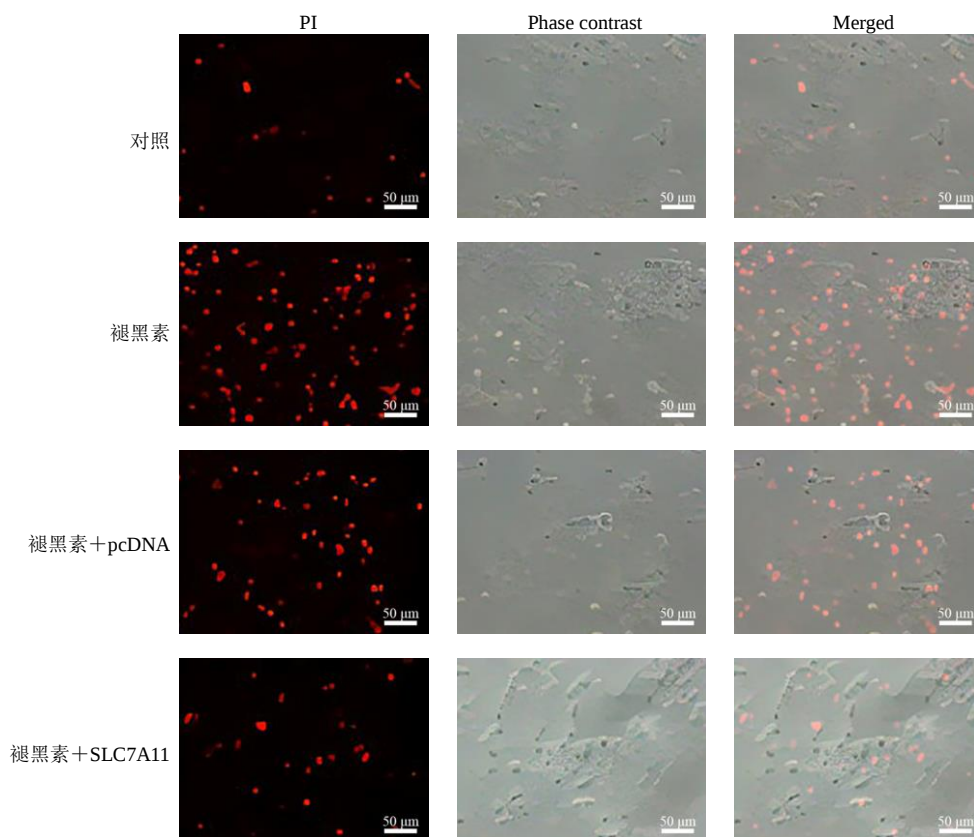


图 3 褪黑素对 KYSE150 细胞死亡的影响
Fig. 3 Effect of melatonin on KYSE150 cell death

表 1 褪黑素对 KYSE150 细胞内 Fe^{2+} 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of melatonin on Fe^{2+} level in KYSE150 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mmol L^{-1})	Fe^{2+} /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	1.15 ± 0.23
褪黑素	1.0	$25.38 \pm 4.56^*$
褪黑素+pcDNA	1.0	23.47 ± 4.72
褪黑素+SLC7A11	1.0	$6.52 \pm 1.09^\#$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与褪黑素+pcDNA 组比较: $^\#P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs melatonin + pcDNA group

使用 0.25 ~ 4.0 mmol/L 褪黑素均可显著降低 KYSE150 细胞增殖活性, 且使用 1.0 mmol/L 褪黑素与铁死亡抑制剂 Fer-1 共同处理 KYSE150 细胞显示, Fer-1 可逆转褪黑素对 KYSE150 细胞的增殖抑制作用, 表明褪黑素可通过铁死亡诱导 KYSE150 细胞死亡。

铁死亡是一种铁依赖性氧化细胞死亡, GSH 是维持细胞内氧化还原平衡的重要成分, ROS 水平反映细胞抗氧化能力, 细胞铁死亡发生时, 表现为线

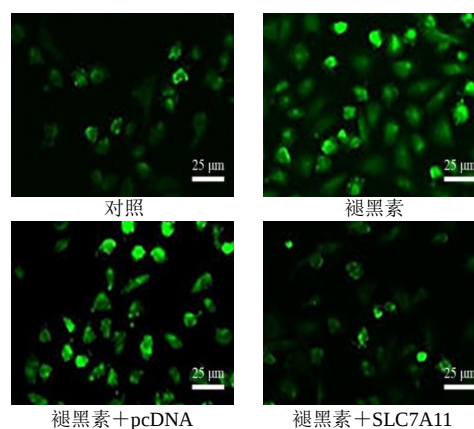


图 4 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 的变化
Fig. 4 Changes of intracellular ROS detected by DCFH-DA fluorescent probe

粒体变小、线粒体膜密度增高、线粒体嵴减少或消失, 细胞内抗氧化能力降低, 细胞内 ROS 大量生成, Fe^{2+} 升高, GSH 水平降低^[15]。本研究使用 1.0 mmol/L 褪黑素处理 KYSE150 细胞 24 h 后, 细胞死亡数目增加, 细胞线粒体变小, 线粒体膜密度增加, 细胞内 Fe^{2+} 水平与 ROS 水平升高, GSH 水平显著

表 2 褪黑素对 KYSE150 细胞内 ROS、GSH 水平的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effects of melatonin on ROS and GSH levels in KYSE150 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mmol L ⁻¹)	GSH/(μmol·L ⁻¹)	相对 ROS 水平
对照	—	5.41 ± 0.93	1.00 ± 0.00
褪黑素	1.0	1.96 ± 0.42*	2.58 ± 0.73*
褪黑素 + pcDNA	1.0	2.13 ± 0.55	2.47 ± 0.86
褪黑素 + SLC7A11	1.0	4.56 ± 0.87 [#]	1.45 ± 0.31 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与褪黑素 + pcDNA 组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs melatonin + pcDNA group

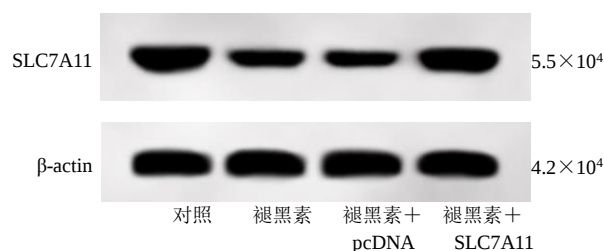


图 5 各组 KYSE150 细胞 SLC7A11 蛋白表达情况

Fig. 5 SLC7A11 protein expression of KYSE150 cells in each group

表 3 褪黑素对 KYSE150 细胞 SLC7A11 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of melatonin on SLC7A11 expression in KYSE150 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mmol L ⁻¹)	SLC7A11 相对表达量
对照	—	1.15 ± 0.13
褪黑素	1.0	0.51 ± 0.08*
褪黑素 + pcDNA	1.0	0.53 ± 0.07
褪黑素 + SLC7A11	1.0	1.03 ± 0.10 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与褪黑素 + pcDNA 组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs melatonin + pcDNA group

表 4 褪黑素对荷瘤小鼠肿瘤体积与质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of melatonin on tumor volume and mass in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	浓度/(mmol L ⁻¹)	肿瘤质量/g	体积/mm ³
对照	—	1.51 ± 0.47	1 125.62 ± 30.46
褪黑素	1.0	0.76 ± 0.22*	392.68 ± 17.73*
褪黑素 + pcDNA	1.0	0.81 ± 0.25	411.32 ± 18.42
褪黑素 + SLC7A11	1.0	1.23 ± 0.31 [#]	675.45 ± 21.23 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与褪黑素 + pcDNA 组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs melatonin + pcDNA group

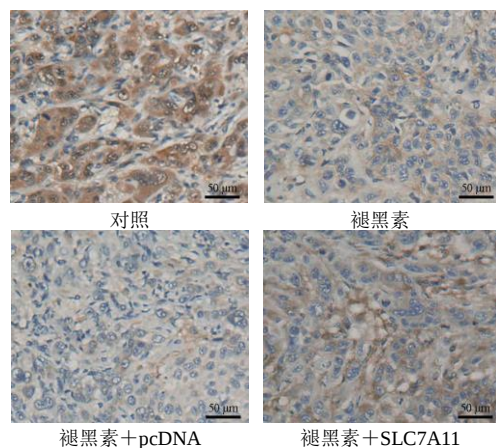


图 6 免疫组化检测肿瘤组织 SLC7A11 蛋白表达 (SP, ×200)

Fig. 6 Immunohistochemical detection of SLC7A11 protein expression in tumor tissue (SP, ×200)

降低, 符合铁死亡特征, 表明褪黑素可诱导 KYSE150 细胞铁死亡。

SLC7A11 为一种氨基酸转运蛋白, 属于溶质载体家族成员, 可与溶质载体家族 3 成员 2 (SLC3A2) 组成胱氨酸/谷氨酸反转运体, 抑制胱氨酸/谷氨酸转运体可促进细胞铁死亡, 导致 SLC7A11 表达代偿性的增加, 研究显示, SLC7A11 在肝癌、食管鳞癌等肿瘤中上调表达, SLC7A11 可通过摄取胱氨酸与合成还原性 GSH 保护细胞损伤及铁中毒^[16-17]。研究显示, SLC7A11 在食管鳞癌组织中上调表达, 与淋巴结转移和患者预后差有关, 且体外细胞实验显示, Nrf2 的过度激活可诱导 SLC7A11 表达, 降低放射治疗诱导的脂质过氧化水平, 促进食管鳞癌放射抗性^[10]。本研究结果显示, 使用 1.0 mmol/L 褪黑素处理 KYSE150 细胞 24 h 后, SLC7A11 表达水平降低; 在乳腺癌中, 二甲双胍可通过抑制 SLC7A11 表达诱导乳腺癌细胞铁死亡^[18]。为进一步探究褪黑素调控 SLC7A11 对 KYSE150 细胞的影响, 将 KYSE150 细胞转染过表达 SLC7A11 质粒后, 使用褪黑素处理, 结果显示, 与褪黑素 + pcDNA 组比较, 褪黑素 + SLC7A11 组细胞死亡数目减少, 细胞线粒体变大, 线粒体膜密度减少, 细胞内 GSH 水平显著升高, Fe²⁺水平与 ROS 水平降低, 提示过表达 SLC7A11 可逆转褪黑素诱导的铁死亡, 表明褪黑素可通过抑制 SLC7A11 表达诱导食管鳞癌细胞铁死亡。另外, 本研究荷瘤小鼠实验显示, 使用褪黑素给予小鼠腹腔给药治疗后, 肿瘤组织 SLC7A11 蛋白表达水平升高, 而裸鼠右侧腋下注射

SLC7A11 过表达质粒 (SLC7A11) 的 KYSE150 细胞后载给予褪黑素, 小鼠肿瘤质量与体积显著升高, 证实褪黑素可通过抑制 SLC7A11 表达抑制肿瘤升高。

综上所述, 褪黑素通过抑制 SLC7A11 表达, 升高细胞内 Fe^{2+} 水平与 ROS 水平, 降低 GSH 水平, 诱导食管鳞癌细胞铁死亡。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张洪典, 梁华刚, 唐鹏, 等. 食管鳞癌新辅助治疗的研究进展与挑战 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(9): 836-842.
- [2] Lu P, Gu J, Zhang N, *et al.* Risk factors for precancerous lesions of esophageal squamous cell carcinoma in high-risk areas of rural China: A population-based screening study [J]. *Medicine* (Baltimore), 2020, 99(31): e21426.
- [3] Mou Y, Wang J, Wu J, *et al.* Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [4] 徐丽, 金清东, 陈秀娇, 等. 褪黑素抑制胃癌细胞系 SGC-7901 的迁移和侵袭 [J]. 解剖学报, 2021, 52(5): 751-758.
- [5] Ataei N, Aghaei M, Panjehpour M. The protective role of melatonin in cadmium-induced proliferation of ovarian cancer cells [J]. *Res Pharm Sci*, 2018, 13(2): 159-167.
- [6] 秦文兵, 张月丽, 刘嘉, 等. 褪黑素通过调控 EZH2 表达增强食管癌细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(2): 188-194.
- [7] Guan Z, Chen J, Li X, *et al.* Tanshinone II_A induces ferroptosis in gastric cancer cells through p53-mediated SLC7A11 down-regulation [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20201807.
- [8] Yadav P, Sharma P, Sundaram S, *et al.* SLC7A11/ xCT is a target of miR-5096 and its restoration partially rescues miR-5096-mediated ferroptosis and anti-tumor effects in human breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 211-224.
- [9] 刘建伟, 徐世宗, 李立, 等. 食管鳞癌组织 ERCC1 及 SLC7A11 的表达水平对新辅助化疗疗效的影响 [J]. 河北医学, 2021, 27(6): 963-968.
- [10] Feng L, Zhao K, Sun L, *et al.* SLC7A11 regulated by NRF2 modulates esophageal squamous cell carcinoma radiosensitivity by inhibiting ferroptosis [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 367.
- [11] Wang S W, Tai H C, Tang C H, *et al.* Melatonin impedes prostate cancer metastasis by suppressing MMP-13 expression [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3979-3990.
- [12] 朱雯婷, 陈亦清, 刘晓敏, 等. 褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖抑制及凋亡作用的相关机制研究 [J]. 中南药学, 2021, 19(8): 1519-1523.
- [13] Ma H, Wang X, Zhang W, *et al.* Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9067610.
- [14] Zhang H, Deng T, Liu R, *et al.* CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemoresistance in gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 43.
- [15] 邱招辉, 张贺平, 李健玲, 等. 远志皂苷元对缺氧/复氧诱导的 PC12 细胞铁死亡的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(6): 988-997.
- [16] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.
- [17] 刘威龙, 张明霞, 郑娟, 等. 溶质载体家族 7 成员 11 基因 SLC7A11 与肝癌临床特征相关性 [J]. 中国热带医学, 2021, 21(6): 559-561.
- [18] Yang J, Zhou Y, Xie S, *et al.* Metformin induces ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 206.

[责任编辑 高源]