

PSME2 和 STAT3 双重抑制通过调控 SLC7A11/GPX4 轴诱导食管鳞癌细胞铁死亡

祁春晖, 张鹤鹭, 吴晓爽, 康永安, 杨静怡, 赵迪, 高社干, 齐义军

河南科技大学临床医学院//河南科技大学第一附属医院, 肿瘤医院//省部共建食管癌防治国家重点实验室//

河南省微生物生态与食管癌防治重点实验室//河南省肿瘤表观遗传实验室, 河南 洛阳 471003

摘要:目的 探究蛋白酶体激活物复合亚基2(PSME2)沉默联合STAT3抑制剂WP1066诱导食管鳞癌(ESCC)细胞死亡的形式及其分子机制。方法 在ESCC细胞(KYSE30, NE6-T)中沉默PSME2并联合WP1066处理。应用不同细胞死亡抑制剂(Ferrostatin-1, Z-VAD-FMK, Necrosulfonamide等)进行表型挽救实验,以鉴别细胞死亡类型;Western blotting检测铁死亡(SLC7A11和GPX4)、凋亡(Cleaved Caspase-3和PARP)、焦亡(GSDME)、坏死性凋亡(RIP)等蛋白质分子表达变化;DCFH-DA和C11-BODIPY荧光探针分别检测细胞内活性氧(ROS)水平和脂质过氧化程度;透射电镜(TEM)观察线粒体超微结构变化。mRNA转录组分析PR171或siPSME2联合WP1066处理的各组细胞间差异表达基因;参考Hallmark及KEGG基因集应用GSEA进行生物学功能富集分析。结果 PSME2和WP1066双重抑制能够诱导ESCC细胞死亡,该致死效应能被铁死亡抑制剂Ferrostatin-1逆转,凋亡(Z-VAD-FMK)次之,但不能被焦亡抑制剂2-Bromohexadecanoic acid和坏死性凋亡抑制剂Necrosulfonamide阻断($P<0.0001$)。siPSME2与WP1066联合处理组ESCC细胞显著下调SLC7A11和GPX4蛋白质分子的表达,同时细胞内ROS水平升高和脂质过氧化物积累($P<0.001$)。TEM显示双重抑制组ESCC细胞线粒体皱缩、嵴减少、膜密度增高等改变。mRNA转录组分析结果显示,PR171和WP1066联合处理组与siPSME2和WP1066联合处理组具有45个共同差异表达基因集,这些基因集的生物学功能富集于应激反应、氧化还原失衡、蛋白翻译/核糖体功能、代谢、细胞周期等多个特征学通路。结论 PSME2和STAT3双重抑制通过调控SLC7A11/GPX4抗氧化轴,促进脂质过氧化积累诱导ESCC细胞铁死亡。

关键词:蛋白酶体激活物复合亚基2;STAT3;食管鳞癌;铁死亡;SLC7A11;GPX4

Dual inhibition of PSME2 and STAT3 induces ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells by regulating the SLC7A11/GPX4 axis

QI Chunhui, ZHANG Heqian, WU Xiaoshuang, KANG Yongan, YANG Jingyi, ZHAO Di, GAO Shegan, QI Yijun

State Key Laboratory of Esophageal Cancer Prevention & Treatment, Henan Key Laboratory of Microbiome and Esophageal Cancer Prevention and Treatment, Henan Provincial Laboratory of Cancer Epigenetics, Cancer Hospital, First Affiliated Hospital, College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: Objective To investigate the form of cell death induced by PSME2 silencing combined with the STAT3 inhibitor WP1066 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells and explore the underlying mechanism. **Methods** ESCC cell lines KYSE30 and NE6-T with PSME2 silencing were treated with WP1066. Phenotypic rescue experiments were performed to determine the predominant form of cell death using different cell death-related inhibitors. Western blotting was used to detect the expressions of the protein markers of ferroptosis, apoptosis, pyroptosis and necroptosis. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels and lipid peroxidation were assessed using DCFH-DA and C11-BODIPY fluorescent probes, respectively. Mitochondrial ultrastructural changes were observed by transmission electron microscopy (TEM). mRNA transcriptomic analysis was performed to identify differentially expressed genes in cells treated with PR171 or siPSME2 combined with WP1066. Gene set enrichment analysis to analyze the enriched biological functions. **Results** Dual inhibition of PSME2 and STAT3 induced obvious ESCC cell death. This lethal effect was markedly reversed by the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 and attenuated by the apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK, whereas 2-bromohexadecanoic acid or necrosulfonamide did not show significant inhibitory effects. The combined treatment with siPSME2 and WP1066 significantly downregulated SLC7A11 and GPX4 protein expressions and increased intracellular ROS levels and lipid peroxide accumulation in ESCC cells. The ESCC cells with dual inhibition showed obvious mitochondrial shrinkage, reduced cristae, and increased membrane density. mRNA transcriptomic analysis identified 45 overlapping differentially expressed genes between the PR171 plus WP1066 group and the siPSME2 plus WP1066 group, enriched in pathways related to stress response, redox imbalance, protein translation/ribosomal function, metabolism, and cell cycle regulation. **Conclusion** Dual inhibition of PSME2 and STAT3 promotes lipid peroxide accumulation and induces ferroptosis in ESCC cells possibly by regulating the SLC7A11/GPX4 antioxidant axis, indicating a therapeutic strategy targeting both PSME2 and STAT3 for ESCC.

Keywords: proteasome activator complex subunit 2; STAT3; esophageal squamous cell carcinoma; ferroptosis; SLC7A11; GPX4

收稿日期:2026-02-18

基金项目:国家自然科学基金(81872037);河南省国际科技合作重点项目(261111520900)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81872037).

作者简介:祁春晖,在读硕士研究生,E-mail:qch1664037558@163.com

通信作者:齐义军,教授,博士生导师,E-mail:qiqiyijun@163.com

食管癌是全球常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别位居所有恶性肿瘤的第7位和第6位^[1]。中国是食管癌高发地区之一,其中超过90%的食管癌为食管鳞状细胞癌(ESCC)。尽管近年来手术、放化疗、免疫治疗等综合治疗手段持续改善,但ESCC患者的5年

生存率仍不足25%^[2],总体预后仍不理想,亟需探索新的治疗策略。本课题组前期已报道,沉默PSME2可抑制ESCC细胞增殖与迁移,但伴随IL-6/STAT3信号通路代偿性激活^[3];PSME2沉默联合STAT3抑制剂WP1066能够导致ESCC细胞显著死亡^[3],但其诱导ESCC细胞死亡的具体形式及分子机制尚未明确。基于此,本研究进一步探讨PSME2沉默联合WP1066诱导ESCC细胞死亡的类型并阐明其分子机制,旨在为ESCC联合靶向治疗提供实验依据。

铁死亡是一种不同于凋亡、坏死性凋亡及自噬的新型程序化细胞死亡方式,主要特征为铁依赖性的脂质过氧化物异常积累以及细胞膜结构破坏^[4-9]。因此,针对传统化疗药物抵抗的肿瘤细胞,靶向诱导铁死亡是克服肿瘤耐药的理想策略。既往研究表明,铁死亡在ESCC发生发展及治疗抵抗中具有重要作用^[10],NRF2/SLC7A11、GPX4、FSP1、泛素化修饰等均能够影响ESCC细胞对铁死亡的易感性^[17,18]。已有研究多聚焦于单一分子、单一信号轴或单药干预条件下的铁死亡调控,而针对PSME2和STAT3双重抑制是否诱导ESCC细胞发生铁死亡的研究尚少。特别是关于该双重干预诱导的细胞死亡类型、与SLC7A11/GPX4抗氧化防御的关系及其转录组变化特征,至今尚无相关研究。

因此,本研究在前期合成致死研究基础上,进一步探讨PSME2沉默联合WP1066诱导ESCC细胞死亡的主要表型,并重点分析其与SLC7A11/GPX4抗氧化防御、脂质过氧化及转录组变化的关系,以期联合靶向PSME2与STAT3的治疗策略提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

ESCC细胞系KYSE30和NE6-T细胞保存于河南科技大学第一附属医院肿瘤表观遗传实验室。RPMI-1640培养基(PM150110)胎牛血清(FBS)(武汉普诺赛公司);细胞转染试剂及相关siRNA(上海吉玛制药技术有限公司);PSME2(2409S)、GAPDH(5174S)、Caspase-3(9662S)、PARP(9542S)、RIP(3493S)等抗体(Cell Signaling Technology);BCA蛋白质定量试剂盒(CW0014S)(康为世纪生物科技股份有限公司);JAK/STAT3抑制剂(WP1066)、卡非佐米(Carfilzomib)、凋亡抑制剂(Z-VAD-FMK,Z-VAD)、焦亡抑制剂(2-Bromohexadecanoic acid)及铁死亡抑制剂(Ferrostatin-1)(MedChemExpress);坏死性凋亡抑制剂(Necrosulfonamide)(TargetMol Chemicals Inc);ECL曝光液(SQ101)(上海雅酶生物医药科技有限公司);乳酸脱氢酶释放检测试剂盒(C0019S)、Calcein/PI(C2015M)细胞活性与细胞毒性检测试剂盒和活性氧

(ROS)检测试剂盒(SOO33S)(上海碧云天生物技术有限公司);丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(BC0025)(北京索莱宝科技有限公司);电镜固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司);脂质过氧化荧光探针(武汉爱博泰克生物科技有限公司);Seahorse XF细胞线粒体压力测试试剂盒、Seahorse XF糖酵解压力测试试剂盒(北京安捷伦科技有限公司);FerroOrange荧光探针(东仁化学科技公司);RNA提取试剂、反转录试剂盒及qRT-PCR检测试剂盒(北京全式金生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染 KYSE30和NE6-T细胞在含5% CO₂的37℃恒温环境中培养,选取对数生长期细胞开展实验。通过转染siControl或siPSME2构建不同处理模型,并设置以下实验组别:siControl组、siPSME2组、siControl联合WP1066组及siPSME2联合WP1066组。

1.2.2 乳酸脱氢酶细胞毒性检测 采用细胞毒性检测试剂盒检测不同处理组细胞乳酸脱氢酶(LDH)含量。根据细胞的大小和生长速度将适量细胞接种到96孔板,加入不同药物进行处理,药物刺激完毕后,直接取细胞培养上清所得上清即为待测样品。加入100 μL LDH检测工作液,37℃下避光孵育1 h,测量吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。

1.2.3 Western blotting检测相关蛋白表达 收集不同处理组KYSE30和NE6-T细胞,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液充分裂解,冰上静置后离心取上清。采用BCA法测定总蛋白浓度,并将各组蛋白样品调整至一致浓度。取等量蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳分离,随后转移至PVDF膜。膜经5%脱脂奶粉室温封闭2 h后,分别加入PSME2(1:1500)、PARP(1:1000)、cleaved PARP(1:1000)、Caspase-3(1:1000)、cleaved Caspase-3(1:1000)、GSDME(1:1000)、RIP(1:1000)、GPX4(1:1000)、SLC7A11(1:1000)及GAPDH(1:2000)等一抗,于4℃孵育过夜。次日用TBST洗膜后,加入酶标二抗(1:5000)室温孵育1 h,再次洗膜后采用ECL化学发光法显影。以GAPDH作为内参,使用ImageJ软件对蛋白条带灰度值进行半定量分析。

1.2.4 活细胞/死细胞检测 采用Calcein/PI细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(碧云天)对细胞存活情况进行评估。细胞接种于96孔板后给予不同药物处理,随后加入Calcein和PI工作液避光孵育30 min。采用荧光显微镜采集图像,并用ImageJ软件对荧光信号进行半定量分析。

1.2.5 丙二醛(MDA)检测 采用MDA检测试剂盒检测细胞脂质过氧化水平。将不同处理的KYSE30和NE6-T细胞收集后,加入裂解液充分裂解并取上清液。按照试剂盒说明书配置反应体系,于95℃水浴反应40 min后迅速冰浴终止反应,室温下静置5 min,3000 r/min离

心 10 min, 取上清测定吸光度 $A_{532\text{nm}}$ 。根据标准曲线计算MDA含量, 结果以 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ 表示。

1.2.6 C11-BODIPY 检测 将 KYSE30 和 NE6-T 细胞培养于共聚焦培养皿, 经药物处理后加入 C11-BODIPY 探针并采用 4% 甲醛室温固定 1 h, 继以 PBS 洗涤 3 次。采用激光共聚焦显微镜采集图像, 绿色荧光表示氧化态脂质, 红色荧光表示还原态脂质, 使用 ImageJ 进行荧光强度定量分析。

1.2.7 ROS 检测 采用 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 水平。将处理后的细胞于培养皿中洗涤 PBS 两次, 加入含 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 探针的无血清培养基孵育 30 min, 避光 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育, 期间轻轻摇动确保染料充分接触细胞。孵育后用 PBS 清洗 3 次去除游离探针, 立即放置于 Evos-M7000 下进行拍照, 绿色荧光强度反映 ROS 相对产生水平, 并使用 ImageJ 进行半定量分析。

1.2.8 电镜检测 用于观察细胞线粒体超微结构变化。收集不同处理组细胞, 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 洗涤 3 次后再用 1% 锇酸固定 1 h。经乙醇梯度脱水 (30%、50%、70%、90%、100% 各 10 min), 树脂包埋并超薄切 70 nm, 染色 (醋酸铀+柠檬酸铅) 后使用透射电镜观察。统计线粒体皱缩、嵴减少、膜密度增高等铁死亡特征。

1.2.9 细胞有氧呼吸和糖酵解检测 使用 Seahorse XF 细胞能量代谢分析仪检测氧耗率 (OCR) 和胞外酸化率 (ECAR)。将细胞以 $2\times 10^4/\text{well}$ 接种于 XF96 板中过夜贴壁, 完成处理后更换为无 CO_2 条件下预平衡的 XF 基础培养基。OCR 检测按顺序注入: Oligomycin $\rightarrow$ FCCP $\rightarrow$ Rotenone/Antimycin A; ECAR 检测按顺序注入: 葡萄糖 $\rightarrow$ Oligomycin $\rightarrow$ 2-DG。仪器实时记录各时间点 OCR 与 ECAR, 分析基础呼吸、ATP 生成呼吸、最大呼吸、糖酵解水平及糖酵解储备能力。

1.2.10 qRT-PCR 检测 采用 qRT-PCR 检测不同处理组 KYSE30 细胞中 SLC7A11 和 GPX4 mRNA 表达水平。各组细胞处理结束后提取总 RNA, 经反转录获得 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 检测。以 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量。每组实验独立重复 3 次。

1.2.11 细胞内 Fe^{2+} 水平检测 采用 FerroOrange 荧光探针检测不同处理组 KYSE30 和 NE6-T 细胞内 Fe^{2+} 水平。细胞处理结束后, 弃去培养基, PBS 轻轻洗涤后加入 FerroOrange 工作液, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育。孵育结束后去除染液并用 PBS 洗涤, 随后采用荧光显微镜采集图像。橙红色荧光代表细胞内 Fe^{2+} 信号强度。

1.3 生信分析

除上述 1.2 的 4 组细胞, 另有 PR-171 组和 PR-171+WP1066 组细胞, 共 6 组, 提取细胞总 RNA, 经建库 RNA-seq 测序后使用 DESeq2 筛选差异表达基因 ($|\log_2\text{FC}|>1$ 且 $\text{FDR}<0.05$), 并鉴定 PR-171+WP1066 组

与 siPSME2+WP1066 组间差异表达基因。对差异表达基因进行 GO、Hallmark 及 KEGG 富集分析, 绘制火山图、热图及富集通路图; 对 PR171+WP1066 组与 siPSME2+WP1066 组的差异表达基因取交集, 筛选 2 种 PSME2 抑制模式联合 STAT3 抑制后共同出现的转录组变化, 并进一步分析其相关生物学通路。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行数据统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示, 两组比较采用独立样本 t 检验, 多组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 铁死亡抑制剂逆转 PSME2 和 STAT3 双重抑制诱导的 ESCC 细胞死亡

与双重抑制组细胞培养上清中 LDH 比较, Fer-1 组 LDH 降低最多 ($P<0.0001$), 其次为 Z-VAD 组 ($P<0.001$); 而 NSA 组和 2-BP 组的抑制作用相对较弱 ($P<0.0001$, 图 1A、B)。Calcein/PI 染色显示不同处理条件下 ESCC 细胞死亡变化, 与双重抑制组相比, Fer-1 和 Z-VAD 干预后 KYSE30 细胞死亡比例分别为 56.48% 和 65.42% ($P<0.01$), 而 NE6-T 细胞分别为 22.52% 和 24.43%; NSA 和 2-BP 预处理组的 KYSE30 细胞, 细胞死亡比例 89.86% 和 81.13%, NE6-T 细胞为 98.20% 和 98.37%, 差异无统计学意义 (图 1C、D), 两组细胞的联合处理红色死亡细胞比例为 70.44% 和 21.78% (图 1C~E)。

2.2 PSME2 和 STAT3 双重抑制下调铁死亡关键靶点分子 GPX4 和 SLC7A11 表达

Western blotting 检测结果显示, siPSME2 处理后的 ESCC 细胞中 PSME2 蛋白水平平均降低 ($P<0.0001$), 沉默效应显著。双重抑制组 ESCC 细胞中凋亡相关分子 cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3 表达水平均有所增加, 而 KYSE30 细胞中 Caspase-3 降低 ($P<0.0001$, 图 2A、B)。与对照组相比, 焦亡效应蛋白质分子 GSDME 和坏死性凋亡的关键效应蛋白质分子 RIP 在各组间差异无统计学意义 (图 2C、D)。在 KYSE30 中, siPSME2 组和双重抑制组铁死亡通路靶点蛋白质分子 GPX4 和 SLC7A11 表达降低 ($P<0.05$), 而 NE6-T 中, siPSME2 组和双重抑制组 GPX4 和 SLC7A11 表达也降低 ($P<0.05$, 图 2E、F)。qRT-PCR 检测结果显示, 双重抑制组 SLC7A11 和 GPX4 mRNA 表达下降 ($P<0.05$), 与 Western blotting 检测到的蛋白质分子表达下调一致 (图 2G)。

2.3 PSME2 和 STAT3 双重抑制诱导 ESCC 细胞脂质过氧化、ROS 积累及线粒体超微结构改变

C11-BODIPY 染色检测脂质过氧化显示, 与 siControl 组相比, 双重抑制组氧化态绿色荧光信号增

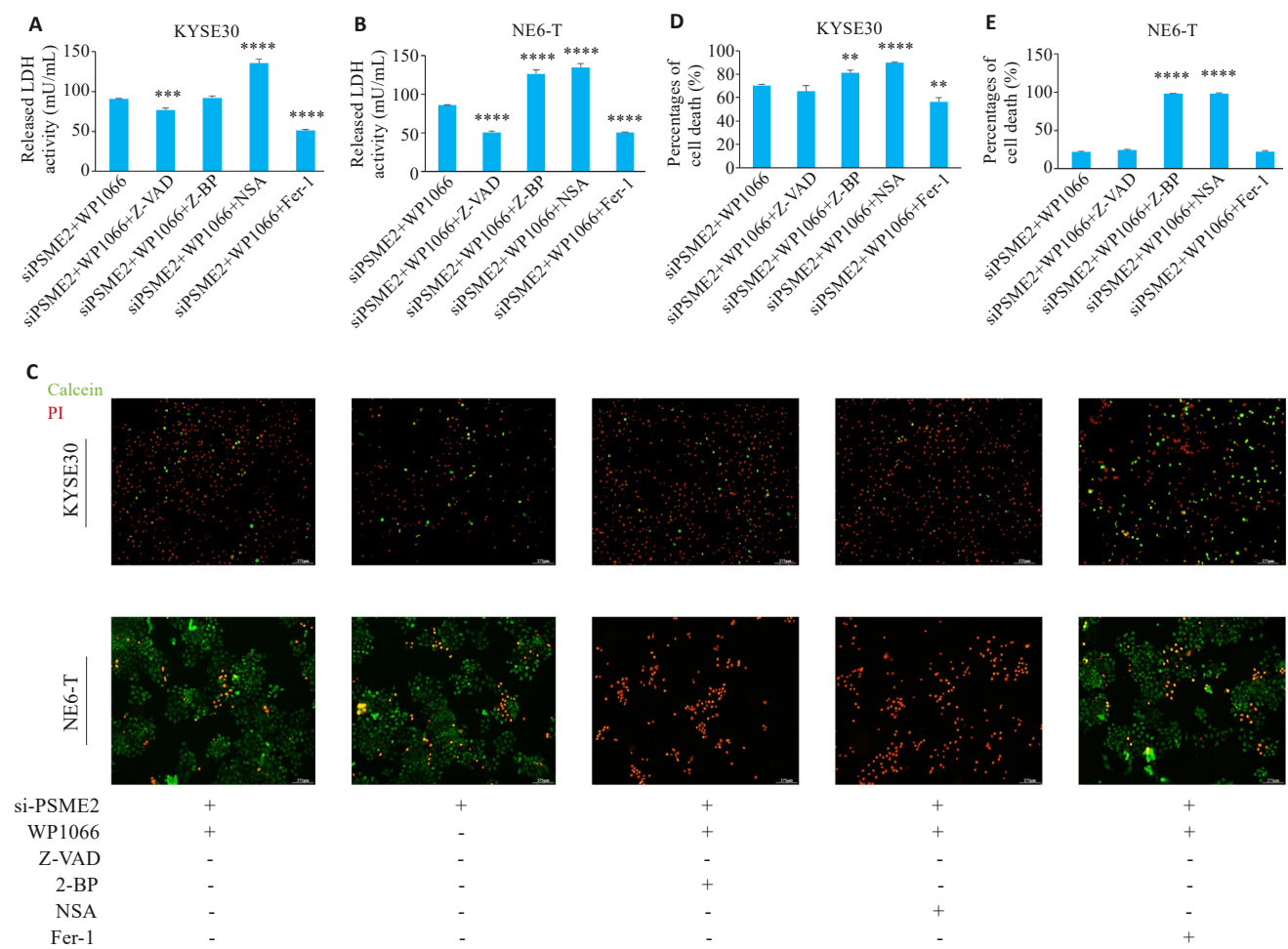


图1 铁死亡抑制剂明显逆转了PSME2和STAT3双重抑制诱导的ESCC细胞死亡

Fig.1 Ferroptosis inhibition markedly reverses cell death induced by dual inhibition of PSME2 and STAT3 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. **A, B:** Released LDH activity (mU/mL) in ESCC cells after different treatments (**A:** KYSE30; **B:** NE6-T). **C:** Immunofluorescence staining of Calcein-AM/PI and quantitative assessment across different groups (green indicates live cells, and red indicates dead cells; scale bar=275 μ m). **D, E:** Quantitative analyses of the percentage of cell death (%) in ESCC cells after different treatments (**D:** KYSE30; **E:** NE6-T). Data are presented as *Mean* $\pm$ *SD* (*n*=3). ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001 vs siPSME2+WP1066.

强,氧化态/还原态荧光比值升高($P<0.001$),双重抑制后ESCC细胞脂质过氧化水平增加(图3A、B)。MDA检测结果显示,与siControl组相比,siPSME2组及双重抑制组MDA水平均升高,其中双重抑制组整体呈更高水平(图3C、D)。透射电镜下,双重抑制组可见线粒体体积缩小、嵴减少或断裂、膜密度增高、空泡样改变等形态学变化(图3E)。DCFH-DA检测结果显示,与siControl组相比,双重抑制组细胞内ROS荧光信号明显增强;与单独处理组相比,双重抑制组整体呈更高ROS水平(图3F、G)。FerroOrange荧光探针检测细胞内 Fe^{2+} 水平,双重抑制组FerroOrange荧光较siControl组信号增强(图3H、I)。

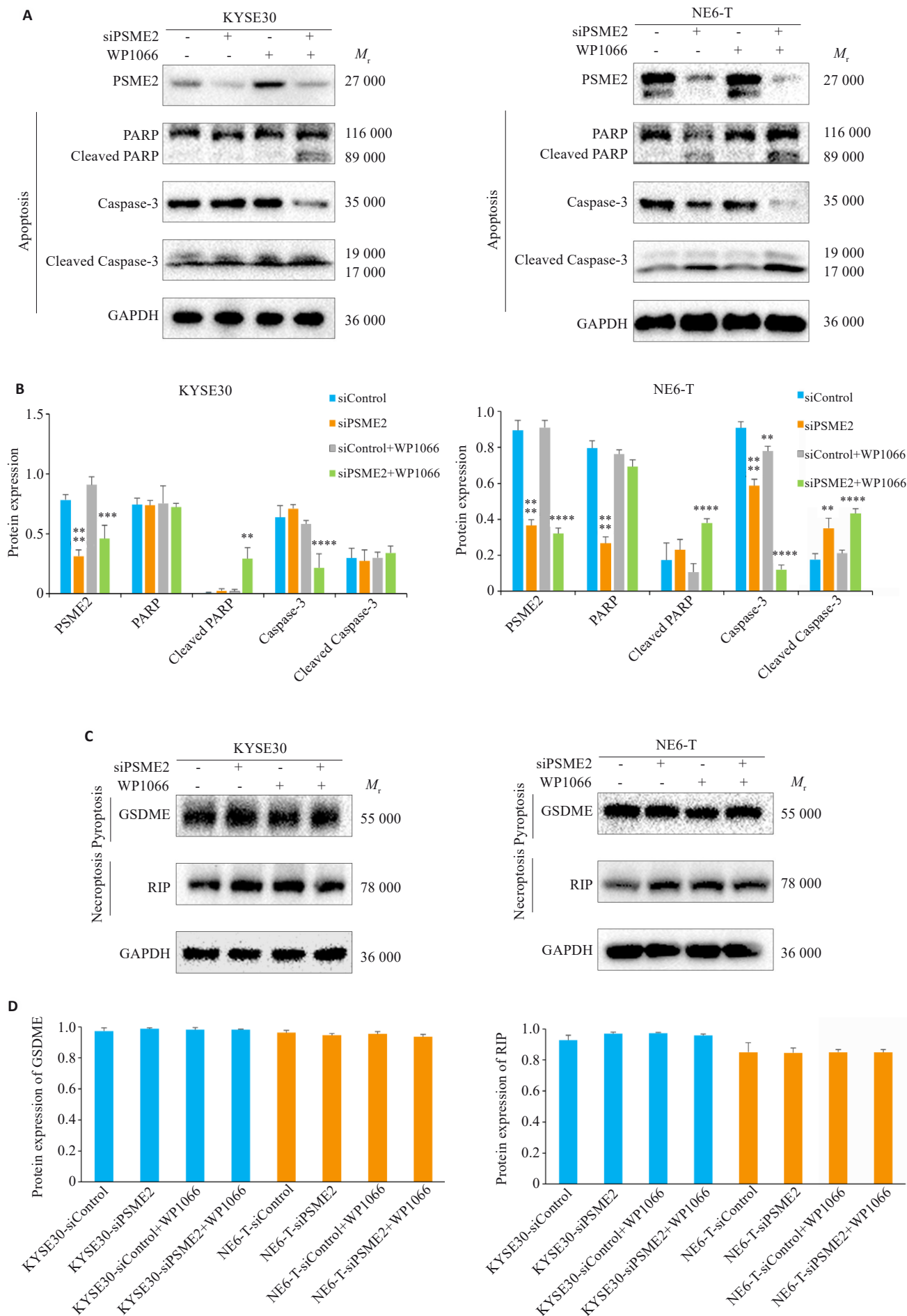
2.4 PSME2和STAT3双重降低ESCC细胞糖酵解水平和线粒体有氧呼吸

双重抑制后线粒体呼吸功能及糖酵解水平降低(图4A、B)。线粒体呼吸功能结果显示,在KYSE30细

胞中,单药处理组与双重抑制组质子泄漏均较对照组呈升高趋势($P<0.01$),但是双重抑制组呼吸储备能力较于其他3组呈负值;而在NE6-T细胞中,siControl+WP1066组基础呼吸、ATP相关呼吸、质子泄漏及呼吸储备能力均较对照组呈降低趋势(图4C)。糖酵解结果显示,在KYSE30细胞中联合抑制组糖酵解水平较对照组呈下降趋势($P<0.05$);而NE6-T细胞亦表现出微弱变化趋势,即双重抑制后糖酵解水平、糖酵解能力及糖酵解储备均较对照组有所降低,但整体变化幅度相对KYSE30较小(图4D)。

2.5 PSME2和STAT3双重抑制相关基因筛选及Hallmark/KEGG富集分析

mRNA测序分析6组ESCC细胞中差异表达基因,结果显示,PR171或siPSME2联合WP1066组间共有45个共同差异表达基因(图5A),这45个基因可能代表两种PSME2抑制模式联合STAT3抑制后共同出现的



续图2

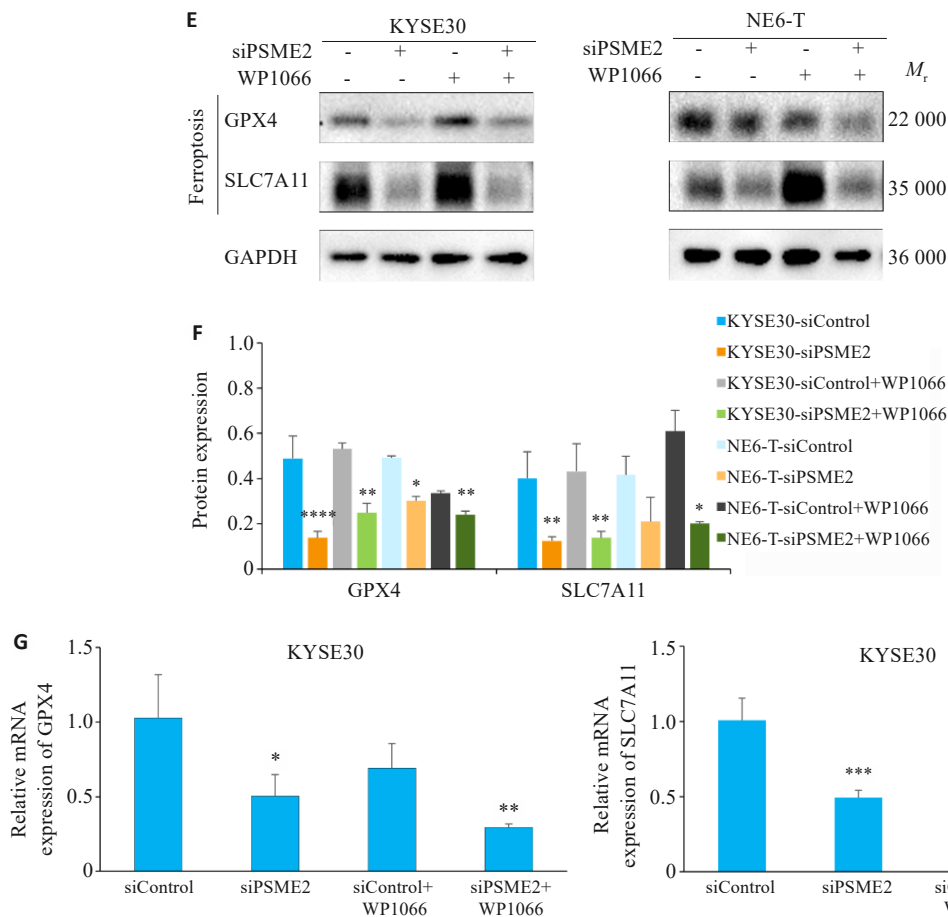


图2 PSME2和STAT3双重抑制下调铁死亡关键靶点分子GPX4和SLC7A11表达

Fig. 2 Dual inhibition of PSME2 and STAT3 induces downregulation of ferroptosis-related molecules GPX4 and SLC7A11. A, B: Western blotting of the protein levels of PSME2, PARP, cleaved PARP, caspase-3 and cleaved caspase-3 in KYSE30 and NE6-T cells. C, D: Results of Western blotting of GSDME and RIP in KYSE30 and NE6-T cells. E, F: Results of Western blotting of GPX4 and SLC7A11 in KYSE30 and NE6-T cells. G: GPX4 and SLC7A11 mRNA expressions in KYSE30 cells. Data are presented as *Mean*±*SD* (*n*=3). **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, *****P*<0.0001 vs siControl.

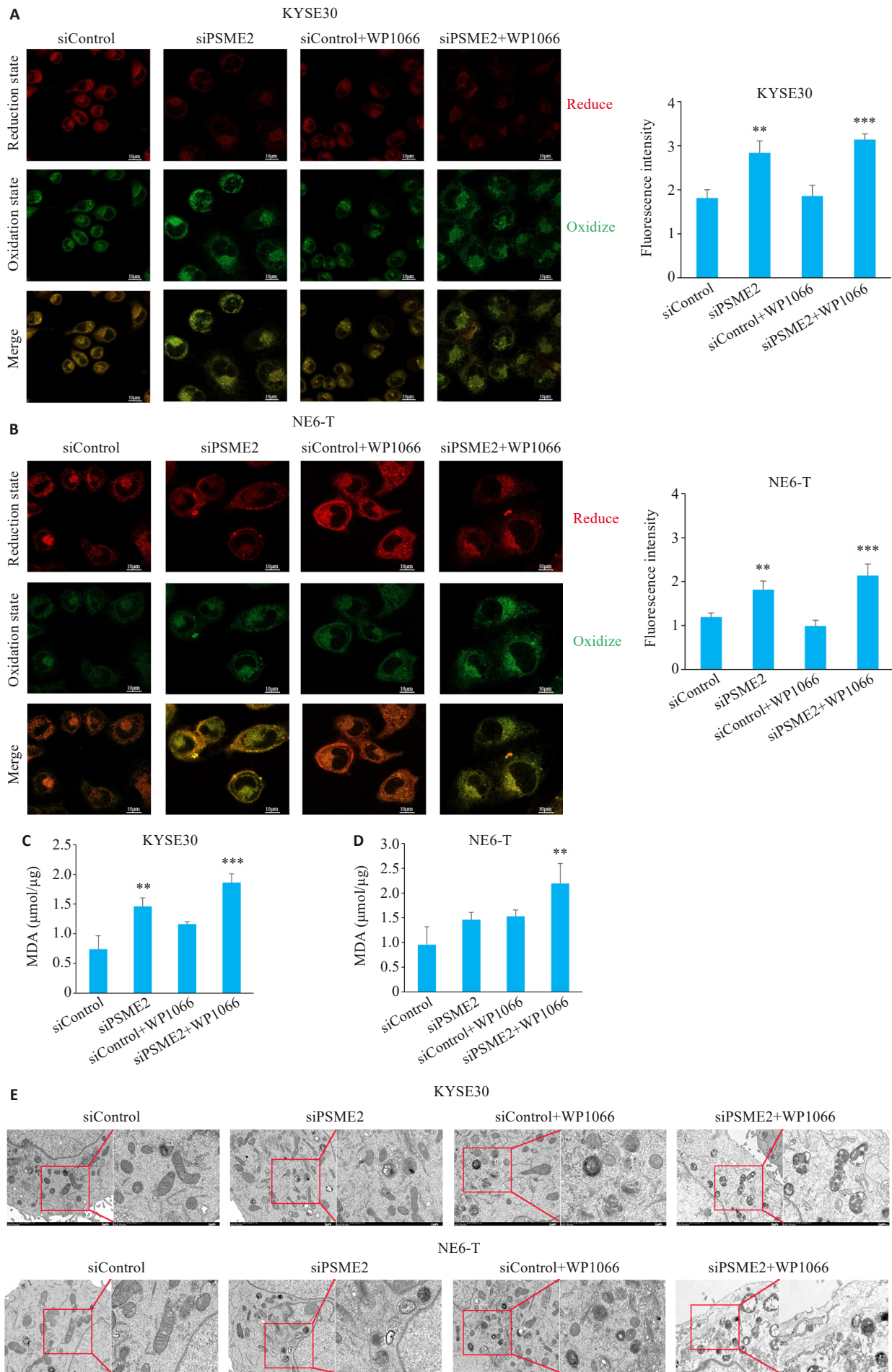
转录组变化。基于这45个共同差异基因进行GSEA分析。在Hallmark基因集中,45个共同差异基因主要富集于细胞周期调控相关通路(如E2F targets、G2M checkpoint)、MYC靶基因通路及DNA损伤/修复相关通路(图5B)PSME2和STAT3双重抑制该基因集与细胞增殖、转录调控及遗传稳定性调控密切相关。KEGG富集分析显示,这些差异基因主要富集于核糖体生成、RNA代谢及代谢调控相关信号通路(图5C),细胞蛋白合成和能量代谢过程改变与双重抑制诱导的细胞死亡过程相关。最后,将该45个差异基因分别与单独处理组(siPSME2、WP1066或PR171)转录组取交集,鉴定到各组间9个共同差异基因,包括TIAM2、MTERF4、LDLRAD3、DDX20、EIF3J、ENSG00000229227等6个上调基因和KREMEN2、MATR3、THADA等3个下调基因(图5D),在Hallmark基因集中。

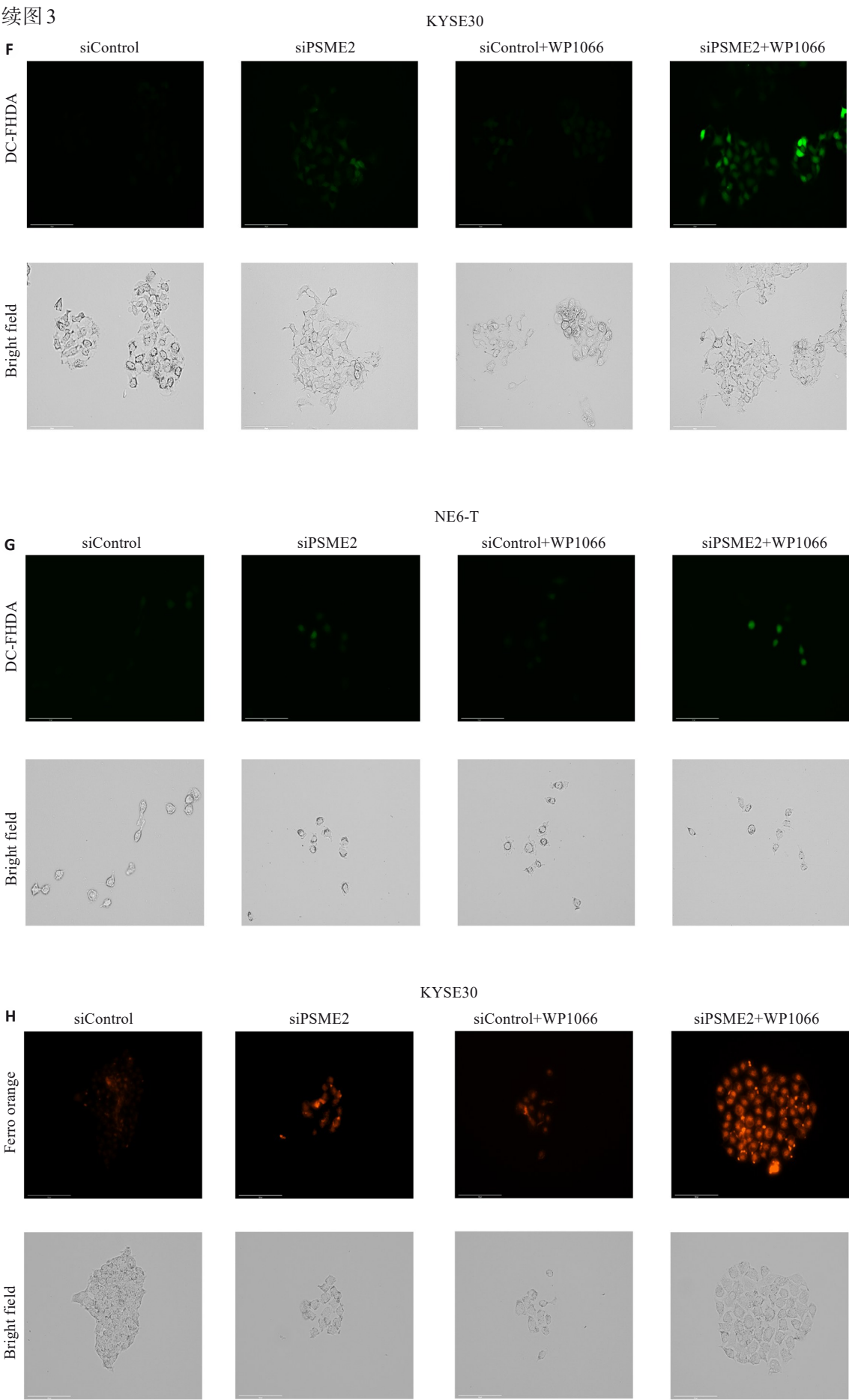
3 讨论

课题组前期发现PSME2沉默可诱导STAT3代偿

性激活^[19],联合STAT3抑制剂WP1066可产生合成致死效应^[3]。本研究在此基础上深入研究,旨在明晰PSME2和STAT3双重抑制诱导的ESCC细胞死亡类型及详细分子机制。本研究发现,Fer-1对双重抑制诱导细胞死亡的逆转程度大于Z-VAD、NSA和2-BP,且双重抑制伴随GPX4和SLC7A11表达下调、ROS积累、脂质过氧化增强以及线粒体皱缩、嵴减少、膜密度增高等超微结构改变,证实铁死亡是PSME2和STAT3双重抑制诱导的ESCC细胞死亡的主要表型。

铁死亡是一种由铁依赖性脂质过氧化驱动的调控性细胞死亡方式,其发生通常伴随细胞内ROS蓄积、膜脂质过氧化增强、GPX4防御系统受损以及线粒体体积缩小、嵴减少、膜密度增高等特征性改变。SLC7A11/GPX4轴是维持细胞脂质过氧化清除能力和谷胱甘肽稳态的核心防御系统,SLC7A11负责半胱氨酸摄取,GPX4则利用谷胱甘肽清除脂质过氧化物,二者表达降低时细胞对铁死亡的易感性明显升高。本研究中





续图3

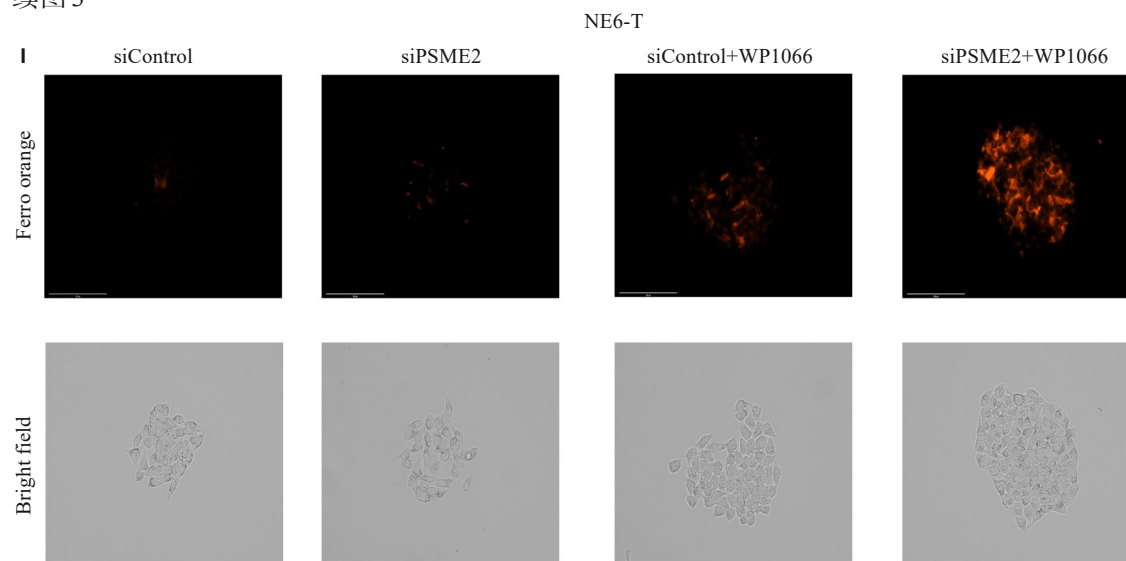
图3 PSME2和STAT3双重抑制诱导ESCC细胞脂质过氧化、Fe²⁺积累、ROS积累及线粒体超微结构改变

Fig.3 Dual inhibition of PSME2 and STAT3 induces lipid peroxidation, Fe²⁺ accumulation, ROS accumulation, and mitochondrial ultrastructural changes in ESCC cells. **A, B:** Lipid peroxidation levels measured by C11-BODIPY fluorescence staining in ESCC cells after different treatments (green for oxidation state, and red for reduction state; **A:** KYSE30; **B:** NE6-T; Scale bars=10 μ m). **C, D:** MDA levels (umol/ug) in ESCC cells after indicated treatments (**C:** KYSE30; **D:** NE6-T). **E:** Transmission electron microscopy of ESCC cells after different treatments (Scale bar=5 μ m). **F, G:** Intracellular ROS detected using DCFH-DA staining in KYSE30 and NE6-T cells (Scale bar=125 μ m). **H, I:** Intracellular Fe²⁺ levels detected using FerroOrange staining in KYSE30 and NE6-T cells (Scale bar=125 μ m). Data are presented as Mean $\pm$ SD ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs siControl.

PSME2和STAT3双重抑制处理后SLC7A11和GPX4蛋白表达同步下调,并伴随C11-BODIPY氧化信号增强、MDA水平升高及TEM下线粒体超微结构改变,说明双重抑制背景下细胞脂质过氧化清除能力下降,与铁死亡表型相一致。

既往ESCC研究多集中于经典铁死亡防御轴的单节点调控。例如,NRF2上调SLC7A11可抑制铁死亡并增强ESCC放疗抵抗^[11];ML385抑制NRF2-SLC7A11通路可增强放疗敏感性^[15];有研究报道食管癌干样细胞可通过活化Hsp27-GPX4通路逃避铁死亡^[12];FSP1与GPX4双高表达与ESCC不良预后相关,联合抑制二者可更强地诱导铁死亡^[13, 20];有研究分别从USP14和USP51介导的GPX4稳定性调控角度揭示了ESCC抗铁死亡的新机制^[14, 16]。与上述研究主要围绕NRF2、FSP1或GPX4单一防御模块不同,本研究表明,PSME2与STAT3双重抑制伴随SLC7A11和GPX4表达下调,并在合成致死背景下诱导明显铁死亡特异性表型,提示蛋白稳态调控与炎症转录信号可能共同影响ESCC细胞抗脂质过氧化防御能力。

除抗氧化防御轴外,本研究还观察到双重抑制同时削弱糖酵解和线粒体呼吸。肿瘤细胞常通过代谢重编程在氧化磷酸化和糖酵解之间切换以维持生存^[21, 22],而谷氨酰胺代谢、mTORC1-GPX4蛋白合成和PI3K-AKT-mTOR脂质代谢均与铁死亡敏感性密切相关^[23-25]。

铁死亡的发生不仅取决于铁依赖性脂质过氧化积累,也与细胞整体代谢状态密切相关。肿瘤细胞可通过代谢重编程调控糖酵解和线粒体呼吸水平,影响ATP生成、NADPH供给、谷胱甘肽合成及ROS产生,以调节其内部的氧化还原平衡。当细胞能量代谢及氧化还原代谢受损时,NADPH和GSH等抗氧化资源供给可能下降,从而削弱GPX4/FSP1等系统对脂质过氧化物的清除能力,使细胞更易发生铁死亡相关损伤^[26]。本研究结果显示,联合处理后KYSE30和NE6-T细胞ECAR和OCR整体下降,提示糖酵解活性和线粒体有氧呼吸均受到抑制。因此,本研究与既往仅报道ESCC铁死亡表型不同,不仅显示联合处理可下调GPX4/SLC7A11,还提示该过程伴随更广泛的能量代谢抑制。既往在其他消化道肿瘤中也有研究表明,STAT3可作为铁死亡的负调控因子,抑制STAT3后可伴随SLC7A11、GPX4等抗氧化防御分子下调并促进脂质过氧化^[27]。相较之下,本研究关注的是ESCC中PSME2与STAT3协同抑制所触发的铁死亡。

既往ESCC铁死亡研究多聚焦于单基因或单药干预,而本研究通过抑制2个分子从而鉴定了45个与双重抑制诱导铁死亡相关差异表达基因,与各单独处理因素比较,又发现了9个与双重抑制相关的关键基因。这9个关键基因富集的通路集中于E2F、G2/M、MYC targets、核糖体生成和RNA代谢,提示双重抑制伴随增

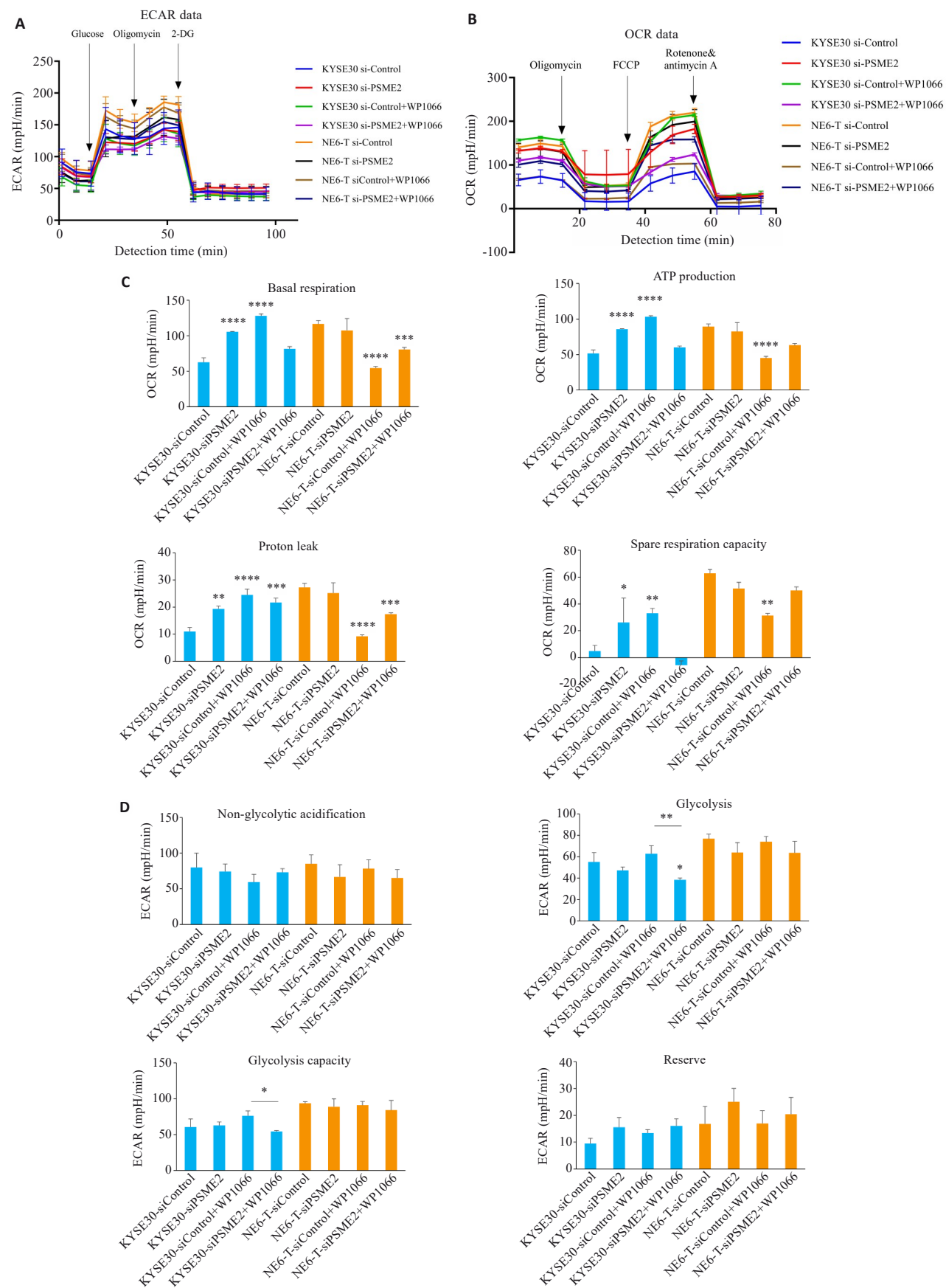


图4 PSME2和STAT3双重抑制降低ESCC细胞糖酵解水平和线粒体有氧呼吸

Fig.4 Dual inhibition of PSME2 and STAT3 reduces glycolytic activity and mitochondrial respiration in ESCC cells.

A: ECAR curves showing glycolysis rates of indicated cells after different treatments. B: OCR curves reflecting mitochondrial respiration capacity. C, D: Quantification of basal respiration, ATP production, proton leak, spare respiration capacity, non-glycolytic acidification, glycolysis, glycolysis capacity and reserve. Data are presented as Mean±SD (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs siControl.

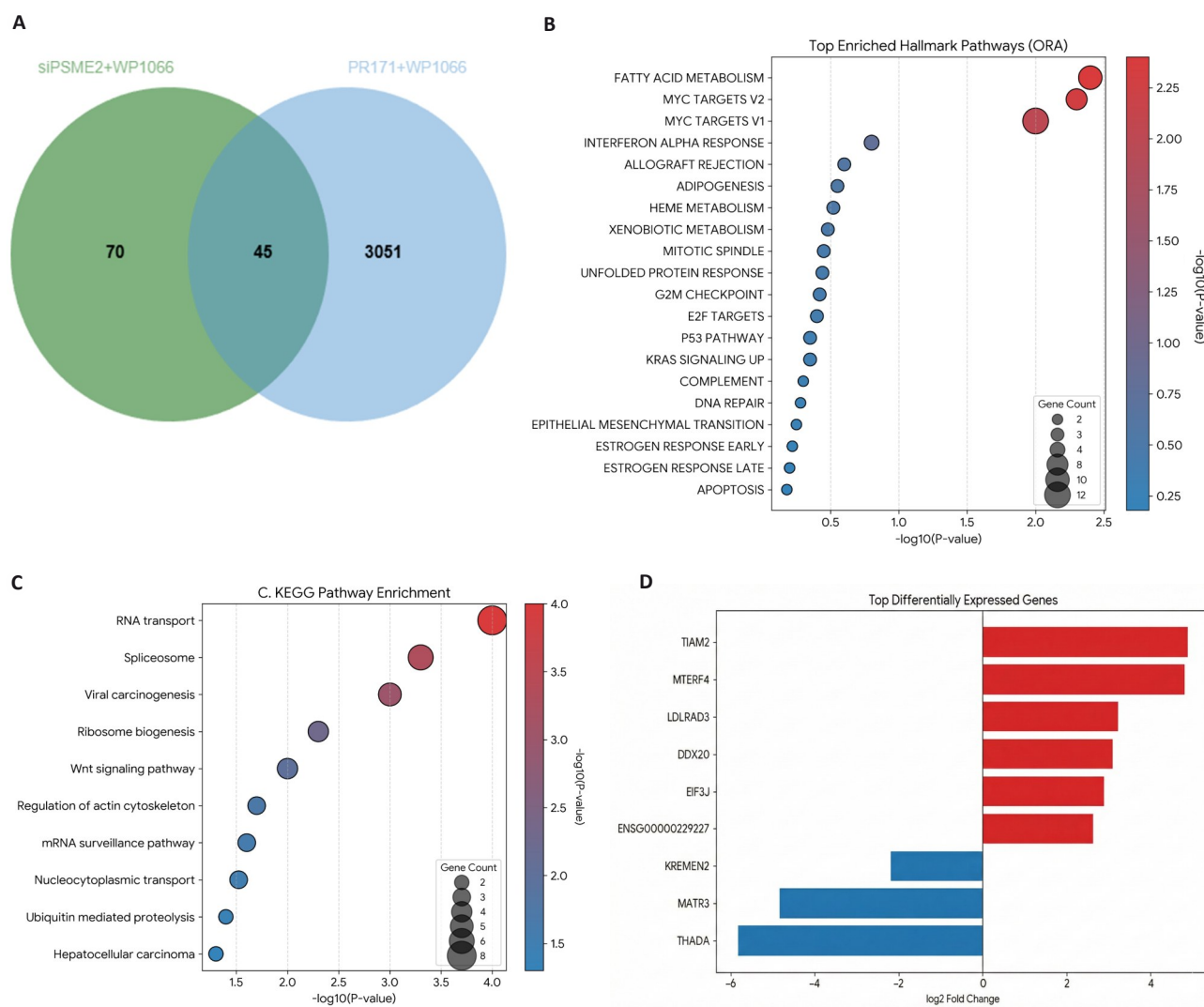


图5 PSME2和STAT3双重抑制相关差异表达基因和关键基因鉴定及Hallmark/KEGG富集分析

Fig.5 Identification of 45 differentially expressed genes (DEGs) and 9 key genes associated with dual inhibition of PSME2 and STAT3 and their Hallmark/KEGG enrichment analyses. **A:** Venn diagram showing 45 overlapping DEGs between PR171+WP1066 and siPSME2+WP1066 groups. **B:** Hallmark enrichment analysis of the overlapping DEGs. **C:** KEGG pathway enrichment of common DEGs. **D:** Intersection analysis of DEGs among PR171+WP1066, siPSME2+WP1066, siPSME2, WP1066, and PR171 groups. Nine candidate DEGs related to combined treatment are retained (Red indicates upregulation and blue indicates downregulation; $\log_2FC > 0$ upregulated genes, $\log_2FC < 0$ downregulated genes).

殖程序、翻译装置及代谢重编程相关转录变化,这些变化可能参与了细胞铁死亡敏感性的增加,但与其与铁死亡之间的直接因果关系仍需进一步验证。半胱氨酸供给和谷胱甘肽稳态的改变可直接影响细胞对铁死亡的易感性^[28]。尤其是,EIF3J位于MYC TARGETS V2基因集中,提示MYC调控的转录/翻译过程可能参与该合成致死过程,MYC是调控肿瘤细胞增殖、物质合成及代谢重编程的重要转录因子^[29,30]。这一点不同于前述围绕GPX4蛋白稳定性或NRF2-SLC7A11抗氧化防御的研究,也为后续从MYC相关翻译调控角度解析ESCC铁死亡提供了新的切入点。

本研究深入探讨了PSME2和STAT3双重抑制诱导ESCC细胞合成致死效应的分子机制,并结合代谢和

mRNA转录组变化特征,表明PSME2和STAT3双重抑制后涉及更广泛的增殖程序、翻译功能及代谢相关调控变化。既往研究分别从肝癌药物敏感性和食管癌铁死亡相关基因表达角度提示,铁死亡调控与消化道肿瘤治疗反应及ESCC抗铁死亡背景有关^[31,32]。本研究则从PSME2和STAT3双重抑制角度,补充了ESCC细胞铁死亡相关表型及SLC7A11/GPX4表达变化的实验依据。

综上,ESCC细胞中PSME2和STAT3双重抑制能够下调SLC7A11/GPX4表达、增强ROS和脂质过氧化、诱导典型线粒体超微结构改变,并伴随糖酵解及线粒体呼吸受损,表明铁死亡为双重抑制所致ESCC细胞死亡的主要形式为联合靶向PSME2与STAT3的ESCC治疗策略提供了实验依据。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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): 209-49.
- [2] Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA, et al. Oesophageal carcinoma [J]. *Lancet*, 2013, 381(9864): 400-12.
- [3] 孙 魁, 陈 攀, 刘永萱, 等. PSME2和STAT3双重抑制通过合成致死效应诱导食管鳞癌细胞死亡[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2024, 40(4): 534-43.
- [4] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-72.
- [5] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-82.
- [6] Tang DL, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications[J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-25.
- [7] Stockwell BR, Jiang XJ, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 478-90.
- [8] Liu X, Chen C, Han D, et al. SLC7A11/GPX4 inactivation-mediated ferroptosis contributes to the pathogenesis of triptolide-induced cardiotoxicity[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3192607.
- [9] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Ferroptosis in disease: mechanisms and therapeutic implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-96.
- [10] Lei G, Zhang YL, Koppula P, et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression[J]. *Cell Res*, 2020, 30(2): 146-62.
- [11] Feng L, Zhao KK, Sun LC, et al. SLC7A11 regulated by NRF2 modulates esophageal squamous cell carcinoma radiosensitivity by inhibiting ferroptosis[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 367.
- [12] Liu CC, Li HH, Lin JH, et al. Esophageal cancer stem-like cells resist ferroptosis-induced cell death by active Hsp27-GPX4 pathway [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(1): 48.
- [13] Miyauchi W, Shishido Y, Matsumi Y, et al. Simultaneous regulation of ferroptosis suppressor protein 1 and glutathione peroxidase 4 as a new therapeutic strategy of ferroptosis for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Esophagus*, 2023, 20(3): 492-501.
- [14] Tao H, Song SJ, Fan ZW, et al. PKC δ inhibits the ferroptosis of esophageal cancer cells via suppressing USP14-mediated autophagic degradation of GPX4[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(1): 114.
- [15] Yan L, Hu HD, Feng L, et al. ML385 promotes ferroptosis and radiotherapy sensitivity by inhibiting the NRF2-SLC7A11 pathway in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2024, 41(12): 309.
- [16] Peng H, He YP, Hu YP, et al. Berberine promotes ferroptosis of esophageal squamous cell carcinoma by facilitating USP51-mediated GPX4 ubiquitination and degradation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117309.
- [17] Jiang B, Zhao YQ, Shi M, et al. DNAB6 promotes ferroptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65(7): 1999-2008.
- [18] Yao WJ, Wang JJ, Meng FR, et al. Circular RNA CircPVT1 inhibits 5-fluorouracil chemosensitivity by regulating ferroptosis through miR-30a-5p/FZD3 axis in esophageal cancer cells[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 780938.
- [19] Yu H, Lee H, Herrmann A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11): 736-46.
- [20] Bersuker K, Hendricks JM, Li ZP, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-92.
- [21] Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 657-69.
- [22] Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-47.
- [23] Gao MH, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298-308.
- [24] Zhang YL, Swanda RV, Nie LT, et al. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 1589.
- [25] Gao MH, Yi JM, Zhu JJ, et al. Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-63.e3.
- [26] Ye LL, Wen XQ, Qin JL, et al. Metabolism-regulated ferroptosis in cancer progression and therapy[J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(3): 196.
- [27] Ouyang S, Li HX, Lou LL, et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer[J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102317.
- [28] Badgley MA, Kremer DM, Maurer HC, et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice[J]. *Science*, 2020, 368(6486): 85-9.
- [29] Dang CV. MYC on the path to cancer[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 22-35.
- [30] Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, et al. MYC, metabolism, and cancer[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(10): 1024-39.
- [31] 朱 权, 黄柏胜, 位磊艳, 等. 过表达 LncRNA MEG3 通过促进铁死亡增强肝癌细胞对顺铂的化疗敏感性[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(1): 17-24.
- [32] 王元国, 张 鹏. 铁死亡抑制基因在食管癌中的高表达分析[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(7): 1389-96.

(编辑: 林 萍)