

哌啶甲苯磺酰脲通过靶向GPX4基因调控人卵巢癌细胞铁死亡

刘思溢, 侯鉴基, 招冠钰, 孙 阳, 刘 义, 吴斌华* (广东医科大学海洋医药研究院, 广东湛江 524023)

摘要:目的 探讨哌啶甲苯磺酰脲(PMSA)对人卵巢癌细胞(SKOV3细胞)活力的影响,及其诱导细胞发生铁死亡的潜在分子机制。方法 SKOV3细胞用不同浓度PMSA(0、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)处理,分别用MTT、Annexin-V-FITC/PI染色、流式细胞术、Western blot检测细胞活力、死亡、活性氧(ROS)、铁死亡相关信号通路分子表达。结果 PMSA以浓度依赖性方式抑制SKOV3细胞活性,增加细胞死亡及ROS含量,减少GPX4和p-Nrf2表达($P < 0.01$ 或0.05)。分子对接预测PMSA与GPX4蛋白直接结合。结论 PMSA通过靶向GPX4诱导SKOV3细胞铁死亡,从而发挥抗癌作用。

关键词: 卵巢癌; 哌啶甲苯磺酰脲; 铁死亡

中图分类号: R 737

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2023)03-0266-06

4-methyl-N-(piperidin-1-ylmethylene) benzenesulfonamide regulates ferroptosis of human ovarian cancer cells through GPX4 gene

LIU Si-yi, HOU Jian-ji, ZHAO Guan-yu, SUN Yang, LIU Yi, WU Bin-hua* (Marine Biomedical Research Institute, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: Objective To study the effect of 4-methyl-N-(piperidin-1-ylmethylene) benzenesulfonamide (PMSA) on activity and ferroptosis of human ovarian cancer cell line SKOV3. Methods After treated with different concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) of PMSA, viability, death, reactive oxygen species (ROS), and ferroptosis-related signaling molecules of SKOV3 cells were detected by MTT, Annexin V-FITC/PI staining, flow cytometry, and Western blot, respectively. Results PMSA dose-dependently inhibited the viability, increased the death and ROS content, and decreased the expression of GPX4 and phosphorylated Nrf2 in SKOV3 cells ($P < 0.01$ or 0.05). Molecular docking results indicated that PMSA could directly bind to GPX4. Conclusion PMSA might play an anti-cancer role by GPX4-targeted induction of ferroptosis in SKOV3 cells.

Key words: ovarian cancer; PMSA; ferroptosis

卵巢癌是一种具有较高发病率和病死率的女性生殖系统癌症^[1]。由于传统的治疗方法存在治疗周期长、副作用大等缺陷,近年来人们正在深入探究更新、更有效的治疗方式^[2]。有研究显示,诱导肿瘤细胞发生铁死亡是治疗卵巢癌等癌症的有效手段^[3-4]。铁死亡是一种由脂质过氧化引起的铁依赖性细胞死亡,它在抑制肿瘤生长中具有重要作用^[5-6],因此开发出一种可以靶向细胞铁死亡并具有抗癌作用的药物对治疗卵巢癌具有重要意义^[7-9]。脲类化合物及其衍生物被广泛应用于生物活性药物设计中,具有抗癌、抗真菌等重要作用^[10-11]。不过目前有关脲类化合物对卵巢癌细胞生长的影响及

其相关分子机制尚未完全阐明。因此,在本研究中,我们通过实验室合成哌啶甲苯磺酰脲(PMSA)^[12],探究其对卵巢癌细胞SKOV3活力的影响,初步分析其诱导细胞发生铁死亡的潜在分子机制,以期为开发和利用磺酰脲类分子药物提供新的思路,从而为卵巢癌的治疗提供更多的依据。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

流式细胞仪(Cytek,美国),细胞培养箱(Thermo,美国),酶标仪(Epoch,美国),DMEM培养基(Gobico,

收稿日期: 2022-12-01

基金项目: 广东省科技计划项目(2019B090905011),湛江市科技研究计划项目(2020B01027、2021B01031),湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2021A05050),广东医科大学大学生创新实验项目(ZYZF007)

作者简介: 刘思溢(1997-),女,在读硕士研究生, E-mail: wenny_ts@163.com

通信作者: 吴斌华(1974-),男,博士,讲师, E-mail: wubinhua@gdmu.edu.cn

美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco, 美国),青链霉素混合液 100×(Solarbio, 中国),胰蛋白酶消化液(Solarbio, 中国),噻唑蓝(MTT)(Beyotime, 中国),结晶紫染色液(Solarbio, 中国),4%多聚甲醛溶液, Fer-1 (MedChemExpress, 美国),活性氧(ROS)检测试剂盒(Beyotime, 中国),BCA蛋白浓度检测试剂盒(Beyotime, 中国),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(Beyotime, 中国),GPX4 抗体(SAB, 美国),ACSL4 抗体(Abcam, 美国),Keap1 抗体(Abcam, 美国),p-Nrf2 (Abcam, 美国)。

1.2 PMSA 的制备^[10]

PMSA 合成物储存在二甲基亚砜(DMSO)中,终浓度为 25.90 mmol/L,使用前用DMEM将PMSA原液稀释至一定浓度,并用 0.22 μm 微孔膜过滤。

1.3 细胞系与培养条件

实验所用的人卵巢癌细胞系 SKOV3 为本实验室保存。培养条件:DMEM 培养基、10% 血清(FBS)、1% 青链霉素混合液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,传代次数≤10代。

1.4 细胞活力的检测

取对数生长期的SKOV3细胞 5 000 个/100 μL 接种至 96 孔板,设置对照(NC)组和实验组,细胞培养至贴壁后,NC 组加入培养基,实验组加入不同浓度的PMSA 或/和Fer-1,处理后置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,然后每孔加入 20 μL MTT(5 g/L),继续培养 4 h,弃孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO 溶液,摇床低速震荡 10 min 加速溶解,用酶标仪在 490 或 570 nm 处测定吸光度值(OD 值),计算细胞活力。

1.5 流式细胞术检测细胞死亡的情况

取对数生长期的SKOV3细胞,1×10⁵ 接种至 12 孔板。分为NC组、PMSA(10 μmol/L)组、Fer-1(1 μmol/L)组、PMSA+Fer-1(10 μmol/+1 μmol/L)组。常规培养 48 h 后,用不含EDTA的胰酶消化收集细胞。预冷的PBS 洗涤细胞 2 次,重悬,依次加入Annexin V-FITC 和PI 染色液,轻轻混匀,避光、室温孵育 10~30 min 后立即用流式细胞仪检测分析。

1.6 活性氧检测试剂盒检测细胞内活性氧(ROS)的表达

取对数生长期的 SKOV3 细胞,1×10⁵ 接种至 12 孔板。分为NC组、PMSA(10 μmol/L)组、Fer-1(1 μmol/L)组、PMSA+Fer-1(10 μmol/+1 μmol/L)组。常规培养 48 h 后,弃上清,PBS 轻轻润洗细胞 2~3 次,各孔加入 1 mL 无血清培养基稀释的DCFH-DA 探针

(1:1 000 稀释至终浓度为 10 mmol/L),37 °C 培养箱避光孵育 30 min。弃上清,无血清培养基洗涤 3 次,PBS 重悬收集细胞,立即用流式细胞仪分析检测。

1.7 Western blot 检测细胞内铁死亡相关信号通路的表达

取对数生长期的SKOV3细胞接种于6孔板,贴壁后,实验组分别加入浓度梯度的PMSA,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后收取细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白,Bicinchoninic acid(BCA)法蛋白定量后进行SDS-PAGE凝胶电泳,电转至聚偏氟乙烯(PVDF)转印膜。先后用兔抗GPX4、ACSL4、p-Nrf2、Keap1 多克隆一抗、辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔第二抗体孵育,结果以化学发光法显示。

1.8 分子对接

从PDB数据库中获得GPX4(PDB ID: 2GS3)的晶体结构,对接前分别构建蛋白质和配体分子,然后使用Discovery Studio 执行分子对接(LibDock),将PMSA分子插入GPX4蛋白结合位点,对接后计算分子对接数值(LibDockScore)以判断PMSA与GPX4的结合程度。

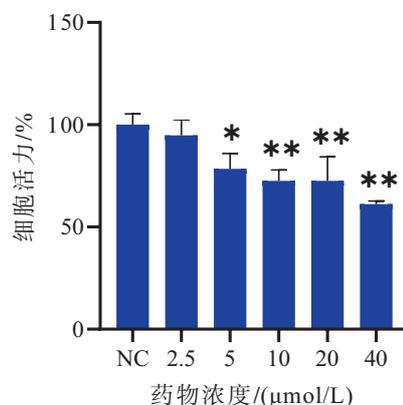
1.9 统计学处理

采用Graphpad Prism 8.0 软件进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用one-way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMSA 对SKOV3 细胞活力的影响

与NC组比较,随着PMSA浓度的升高,SKOV3 细胞活力显著降低($P < 0.05$ 或 0.01),见图 1。



与NC组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图1 不同浓度PMSA对SKOV3细胞活力的影响

2.2 PMSA 诱导SKOV3 细胞发生铁死亡

PMSA 处理 SKOV3 细胞 48 h 后, 0.1~1 μmol/L

Fer-1 对 SKOV3 细胞活力均无明显改变 ($P>0.05$), 而 2 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 对细胞略有细胞毒性 ($P<0.05$), 因此我们采用 1 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 用于后续实验, 见图 2。细胞凋亡检测结果显示, NC、Fer-1、PMSA、PMSA+Fer-1 组中的 Annexin-V⁺/PI⁺ 细胞比率分别为 (5.07 \pm 0.50) %、(3.84 \pm 0.84) %、(12.10 \pm 0.79) % 和 (7.95 \pm 0.28) %。与 NC 组比较, PMSA 可以显著增加 SKOV3 细胞死亡率 ($P<0.01$), 而 Fer-1 则显著抑制 PMSA 作用下细胞死

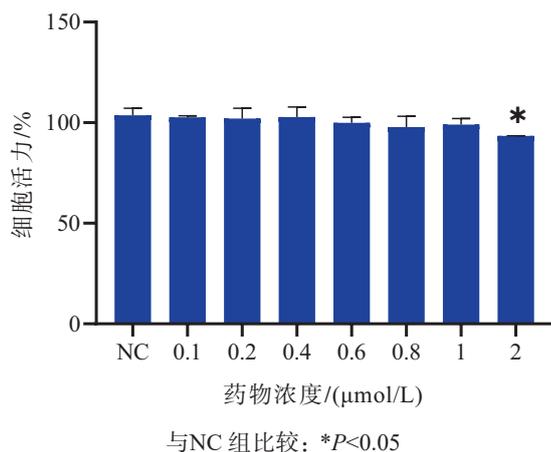


图2 不同浓度的 Fer-1 对 SKOV3 细胞毒性的影响

亡率的升高 ($P<0.01$), 见图 3。此外, ROS 检测结果显示, NC、Fer-1、PMSA、Fer-1+PMSA 组的 ROS 表达量分别为 (4.70 \pm 0.12) %、(4.20 \pm 0.28) %、(14.77 \pm 0.31) % 和 (5.63 \pm 0.15) %。与 NC 组比较, PMSA 可以显著增加 SKOV3 细胞内 ROS 的含量 ($P<0.01$), 而 Fer-1 则显著抑制 PMSA 作用下细胞内 ROS 的产生 ($P<0.01$), 见图 4。

2.3 PMSA 对 SKOV3 细胞内铁死亡相关信号通路蛋白表达水平的影响

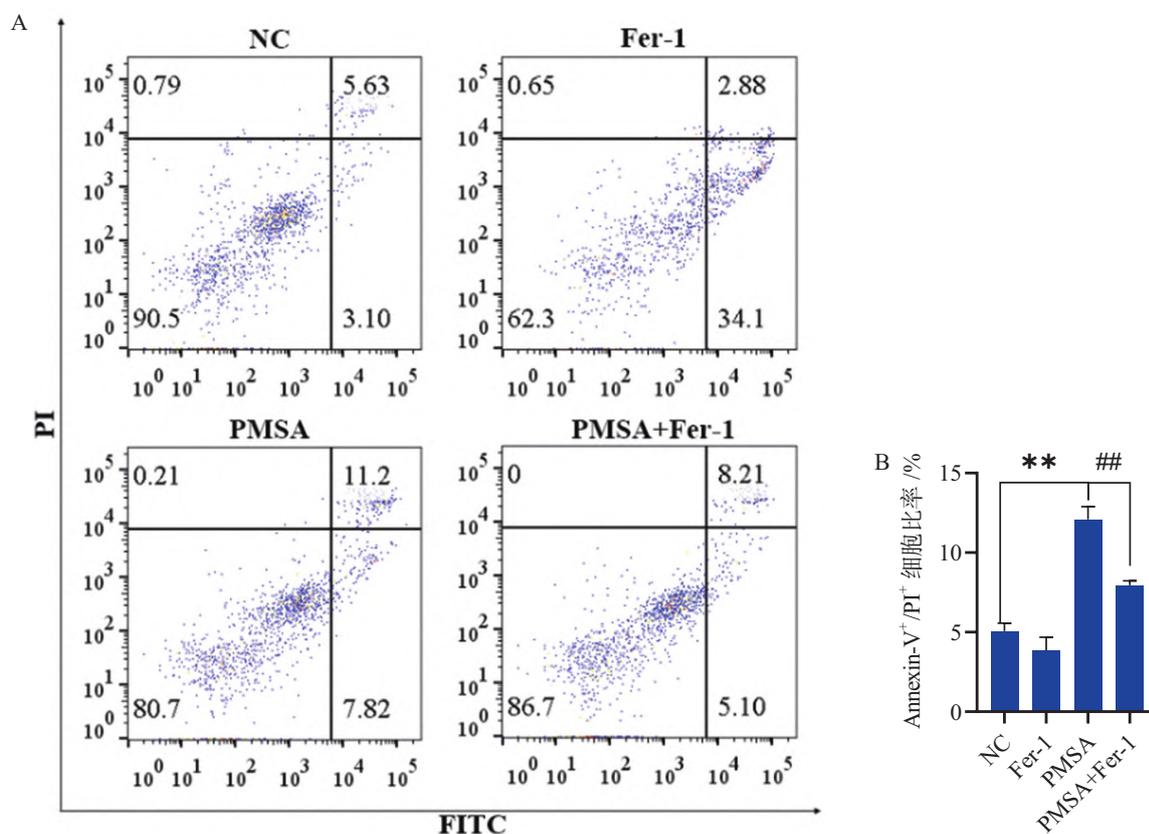
与 NC 组比较, 随着 PMSA 浓度的升高, GPX4 和 p-Nrf2 蛋白表达水平呈剂量依赖下降 ($P<0.01$), Keap1 水平则无明显改变 ($P>0.05$), 见图 5。

2.4 PMSA 通过靶向 GPX4 基因诱导 SKOV3 细胞发生铁死亡

如图 6 所示, PMSA 能与 GPX4 蛋白进行对接, LibDockScore 为 88.05, 二者在氨基酸 ARG36 处形成一个距离为 2.65 \AA 的氢键。

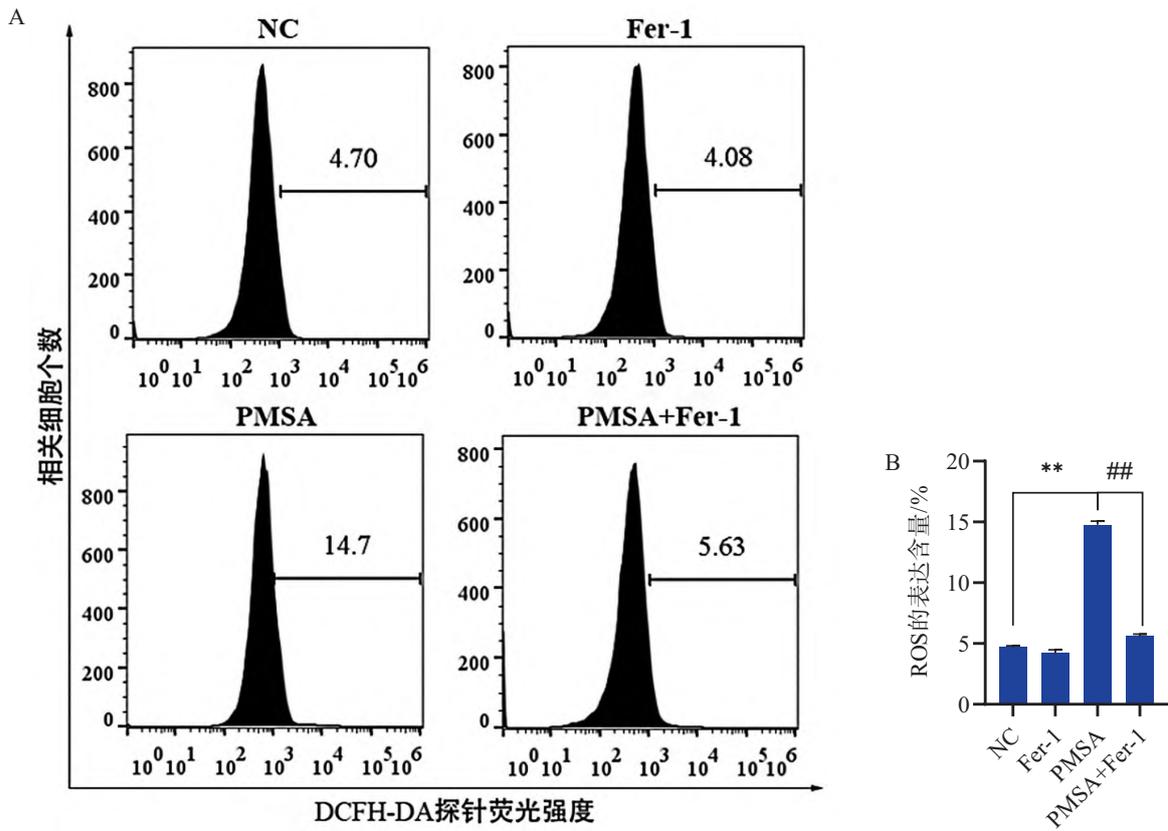
3 讨论

卵巢癌由于具有早期症状不明显、预后差等特点,



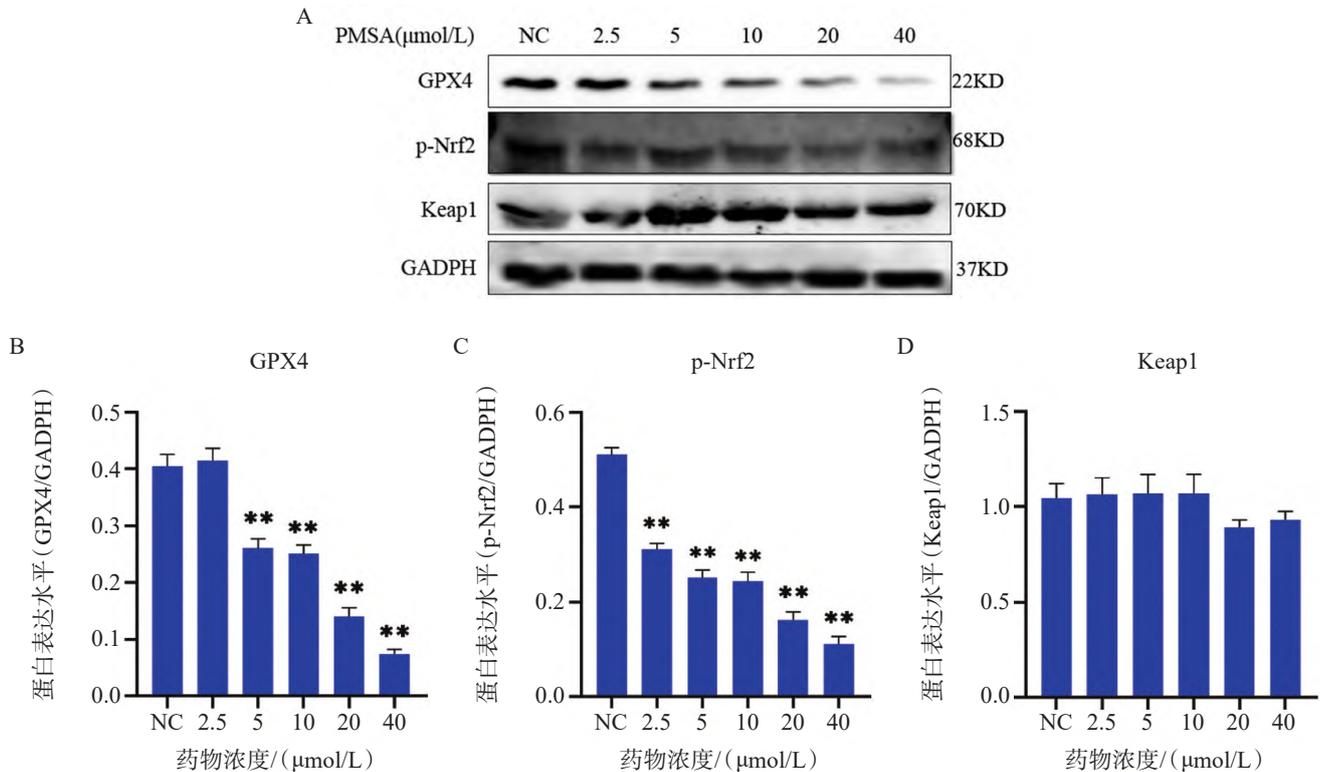
A. SKOV3 细胞在有或无 Fer-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) 的情况下, 与 PMSA (10 $\mu\text{mol/L}$) 共培养 48 h 后用流式细胞术检测细胞死亡的代表图像; B. 与 NC 组比较: ** $P<0.01$, 与 PMSA 组比较: ## $P<0.01$

图3 Fer-1 对 PMSA 诱导的 SKOV3 细胞的影响



A. SKOV3 细胞在有或无Fer-1 (1 $\mu\text{mol/L}$) 的情况下, 与PMSA (10 $\mu\text{mol/L}$) 共培养 48 h 后用流式细胞术检测细胞内ROS 的代表图像; B. 与NC 组比较: ** $P < 0.01$, 与PMSA 组比较: ## $P < 0.01$

图 4 Fer-1 对PMSA 诱导的SKOV3 细胞内ROS 水平的调控



A. SKOV3 细胞经不同浓度PMSA 处理后的western blot 结果; B~D. 与NC 组比较: ** $P < 0.01$

图 5 PMSA 对SKOV3 细胞内铁死亡相关基因蛋白表达水平的调控

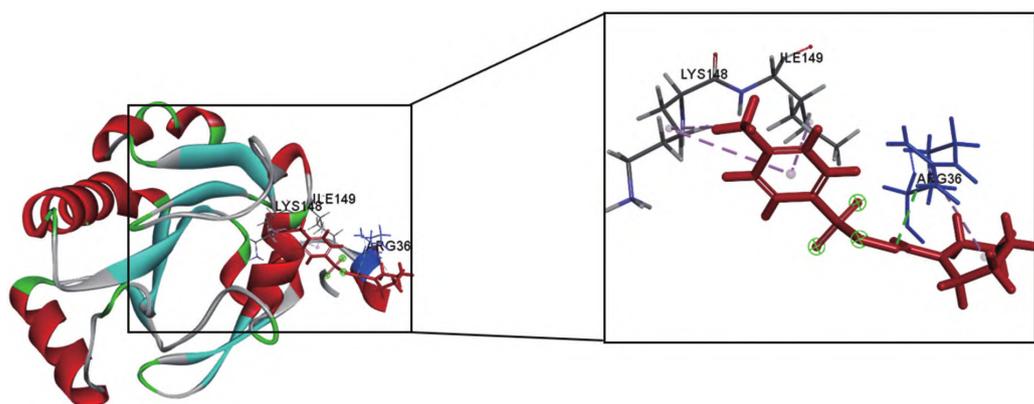


图6 PMSA和GPX4蛋白配体进行分子对接后所得的结合位点及3D图像

其发病率和病死率在妇科癌症中一直高居首位。目前治疗卵巢癌的方法主要以外科手术和化疗为主,但化疗等传统治疗方法存在一定局限性^[13],因此人们需要研发其他更加安全、有效的方式和药物治疗卵巢癌。研究发现分子靶向药物可以通过诱导肿瘤细胞死亡以发挥抗癌作用,它们与传统的药物相比具有更高的效价、更低的毒性及更强的靶向性^[14],如脘类化合物及其衍生物是一种重要的药物中间体,它们可用作消炎药、驱虫药、抗癌药等^[10-11],但其发挥抗癌作用的具体方式和分子机制还不是非常清楚。本文通过实验室合成磺酰脘类化合物PMSA并将其作用于卵巢癌细胞SKOV3,初步探讨了PMSA发挥抗癌作用的方式和相关分子机制,

结果显示,随着PMSA浓度的升高,SKOV3细胞的活力呈剂量依赖型降低;PMSA可以显著增加SKOV3细胞的死亡率,铁死亡抑制剂Fer-1则可改变这一现象,表明PMSA可以抑制SKOV3细胞的生长以及诱导细胞发生死亡,并且该死亡方式可能是铁死亡。

铁死亡是近年新发现的程序性细胞死亡,在细胞成分方面它可以表现为细胞内ROS升高。本研究结果显示,PMSA可以显著增加SKOV3细胞内ROS的积累,Fer-1则可抑制这一过程。这符合铁死亡的相关特征。

在分子机制上,一些基因已经被证明参与调节肿瘤细胞的铁死亡,它们是诱导细胞发生铁死亡的重要调控机制^[15]。Keap1/Nrf2是一种经典的铁死亡相关信号通路。研究表明在各种癌症中Nrf2信号通路组成性激活可能会促进癌细胞的生长和增殖,Nrf2的上游靶点Keap1也可能是诱导铁降解依赖性癌细胞死亡的可行靶点^[16]。另外,在细胞和小鼠中进行的大量遗传研究已经表明GPX4是铁死亡的关键负调控因子^[17]。本研究

结果发现,PMSA可以使SKOV3细胞中GPX4和p-Nrf2的蛋白表达水平呈剂量依赖性降低,但PMSA并未明显改变Keap1蛋白的表达水平,表明PMSA主要是通过调控GPX4和p-Nrf2诱导SKOV3细胞发生铁死亡,而不是通过Keap1。此外,我们也将上述基因中的GPX4与PMSA进行了分子对接实验,结果表明PMSA可以与GPX4的蛋白活性位点直接结合。这一结果进一步证明PMSA可以通过靶向GPX4发挥抗癌作用。

综上,PMSA可以降低卵巢癌细胞SKOV3的活力,并可以通过靶向GPX4诱导细胞发生铁死亡,从而发挥抗癌作用。

参考文献:

- [1]MORAND S,DEVANABOYINA M,STAATS H, et al. Ovarian cancer immunotherapy and personalized medicine[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6532-6551.
- [2]RENDELL A,THOMAS-BLAND I,MCCUISH L, et al. Targeting tyrosine kinases in ovarian cancer: Small molecule inhibitor and monoclonal antibody, where are we now?[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(9): 2113-2137.
- [3]PENG F,LIAO M,QIN R, et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: Key pathways and targeted therapies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 286.
- [4]CHRISTGEN S,TWEEDELL R E,KANNEGANTI T D. Programming inflammatory cell death for therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 232: 108010.
- [5]BEDOUI S,HEROLD M J,STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 678-695.
- [6]WANG Y,WEI Z,PAN K, et al. The function and mechanism of ferroptosis in cancer [J]. *Apoptosis*, 2020, 25(11-12): 786-798.
- [7]XU T,DING W,JI X, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy [J]. *J Cell Mol Med*,

(下转第278页)

化程度的诊断性能。同时,因没有纳入肝功能异常患者作为研究对象,无法判断在肝功能异常情况下ViTE与FibroScan测量肝硬度值的差异性,后期我们将继续深入研究。

综上,ViTE与FibroScan原理相似,两者测值高度正相关,一致性好,均可用于诊断有无明显肝纤维化。但ViTE具有实时超声图像引导和双环质控系统,有望提升测量结果的准确性及可信度,具备鉴别诊断有无明显肝纤维化的能力。

参考文献:

- [1] ZHOU Y, HU C, YUAN G, et al. Antiviral and antifibrotic therapies reduce occurrence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B and liver fibrosis: A 144-week prospective cohort study[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2019, 39(6): 633-640.
- [2] 张芹, 吴意赟, 殷立平, 等. 剪切波弹性成像评估正常成人及慢性肝病患者肝脏硬度稳定性的研究[J]. *医学影像学杂志*, 2018, 28(4): 608-610.
- [3] 李沁园, 董常峰, 姜伟. 超声弹性成像对肝纤维化的诊断及应用[J]. *新发传染病电子杂志*, 2020, 5(3): 207-211.
- [4] 中国肝炎防治基金会, 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学会, 等. 瞬时弹性成像技术诊断肝纤维化专家共识(2018年更新版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019(3): 182-191.
- [5] HUANG L L, YU X P, LI J L, et al. Effect of liver inflammation on accuracy of FibroScan device in assessing liver fibrosis stage in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(7): 641-653.
- [6] REN X, ZHANG L, XIA S, et al. A new visual transient elastography technique for grading liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. *Ultrasound Q*, 2020, 37(2): 105-110.
- [7] 杨家丽, 李加伍, 叶桂林, 等. 对比声触诊弹性成像与可视化瞬时弹性成像检测肝脏弹性[J]. *中国医学影像技术*, 2022, 38(1): 103-107.
- [8] YANG J, LI J, YE G, et al. Comparison of visual transient elastography and shear wave elastography in evaluating liver fibrosis in patients with chronic liver disease[J]. *Int J Gen Med*, 2021, 14: 3553-3561.
- [9] GAO L, PARKER KJ, LERNER RM, et al. Imaging of the elastic properties of tissue—a review[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1996, 22(8): 959-977.
- [10] SANDRIN L, FOURQUET B, HASQUENOPH J M, et al. Transient elastography: A new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(12): 1705-1713.
- [11] MUELLER S, SANDRIN L. Liver stiffness: A novel parameter for the diagnosis of liver disease[J]. *Hepat Med*, 2010, 2: 49-67.
- [12] XIA S, REN X, NI Z, et al. A noninvasive method—shear-wave elastography compared with transient elastography in evaluation of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B[J]. *Ultrasound Q*, 2019, 35(2): 147-152.
- [13] 董丙田, 黄枢, 常建东, 等. 声触诊弹性成像与4项血清纤维化指标评估慢性乙型肝炎肝纤维化的效能比较[J]. *中华肝脏病杂志*, 2020(3): 269-270.
- [14] ZHOU Z, ZHAO Y, ZHOU D, et al. Rapid and efficient synthesis of formamidines in a catalyst-free and solvent-free system [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(54): 33868-33871.
- [15] MUN E J, BABIKER H M, WEINBERG U, et al. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2): 266-275.
- [16] BEDARD P L, HYMAN D M, DAVIDS M S, et al. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology [J]. *Lancet*, 2020, 395(10229): 1078-1088.
- [17] CHEN X, YU C, KANG R, et al. Cellular degradation systems in ferroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4): 1135-1148.
- [18] SAJADIMAJD S, KHAZAEI M. Oxidative stress and cancer: The role of Nrf2 [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2018, 18(6): 538-557.
- [19] SHA R, XU Y, YUAN C, et al. Predictive and prognostic impact of ferroptosis-related genes ACSL4 and GPX4 on breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy [J]. *EBioMedicine*, 2021, 71: 103560-103578.

(上接第270页)

2019, 23(8): 4900-4912.

- [8] SU Y, ZHAO B, ZHOU L, et al. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs [J]. *Cancer Lett*, 2020, 483: 127-136.
- [9] EL ABED D, ADICHE C, HAMADOUCHE M. Facile synthesis of sulfonyl amidines by 1, 3-dipolar cycloaddition between 1-morpholinocycloalkenes and sulfonyl azides without catalyst [J]. *HETEROCYCLES*, 2016, 92: 1614.
- [10] ZHAO Y, ZHOU Z, CHEN M, et al. Copper-catalyzed one-pot synthesis of n-sulfonyl amidines from sulfonyl hydrazine, terminal alkynes and sulfonyl azides [J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3700.
- [11] GOBIS K, FOKS H, SŁAWIŃSKI J, et al. Synthesis, structure, and biological activity of novel heterocyclic sulfonyl-carboximidamides [J]. *Monatsh Chem*, 2013, 144(5): 647-658.
- [12] ZHOU Z, ZHAO Y, ZHOU D, et al. Rapid and efficient