

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2023.02.003

# 去铁胺诱导的自噬增加线粒体内铁的含量并促进三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移

杜佩珊, 王士成, 刘苹

(上海交通大学生物医学工程学院, MED-X 研究院, 上海 200030)

**【摘要】** 癌细胞转移是乳腺癌患者死亡的主要原因, 铁代谢异常造成的铁超载能促进乳腺癌细胞的增殖和迁移。去铁胺 (DFO) 是被广泛使用的铁螯合剂, 能抑制多种肿瘤细胞的增殖, 降低雌激素受体 (ER) 阳性人类乳腺癌细胞中的铁含量, 但增加了三阴性乳腺癌 (TNBC) 细胞中的铁含量。此外, DFO 可以增加线粒体内铁的含量, 然而线粒体内铁的来源尚不清楚。该研究通过免疫荧光、蛋白质印迹及电感耦合等离子质谱, 分析侵袭性乳腺癌 MDA-MB-231 和非侵袭性乳腺癌 MCF-7 中的铁代谢和自噬相关蛋白, 利用自噬抑制剂探究线粒体铁增多的机制。该研究发现, DFO 能通过诱导铁蛋白自噬促进线粒体内铁积累增加, 从而促进 TNBC 细胞的上皮-间质转化与迁移。经过 DFO 处理, 线粒体钙离子单向转运蛋白 (MCU) 和线粒体铁转运蛋白 1 (Mfrn1) 可能参与了铁从细胞质向线粒体的转运。该研究为临床中探寻新的靶向铁代谢治疗三阴性乳腺癌的方式提供了研究基础。

**【关键词】** 去铁胺; 自噬; 铁; 三阴性乳腺癌

**【中图分类号】** R730.231, {Q28}

**【文献标志码】** A

文章编号: 1674-1242 (2023) 02-0128-11

## Deferoxamine-induced Autophagy Increases Mitochondrial Iron Content and Promotes Cell Migration in Triple-Negative MDA-MB-231 Cells

DU Peishan, WANG Shicheng, LIU Ping

(MED-X Research Institute, Shanghai Jiao Tong University School of Biomedical Engineering, Shanghai 200030, China)

**【Abstract】** Cancer cell metastasis is a major cause of death for breast cancer patients, and iron overload due to abnormal iron metabolism could promote proliferation and migration of breast cancer cells. The deferoxamine (DFO) is widely used, which inhibits the proliferation of tumor cells and decreases the iron content in estrogen receptor (ER)-positive human breast cancer cells but increases the iron content in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. In addition, DFO could increase the iron content of mitochondria. However, the source of iron in mitochondria remains unclear. Iron metabolism and autophagy-related proteins in aggressive breast cancer MDA-MB-231 and nonaggressive breast cancer MCF-7 were examined by immunofluorescence, western blot and inductively coupled plasma-mass spectrometry. The possible regulatory mechanism of increased mitochondrial iron was explored by autophagy inhibitor. In this study, we found that iron content in mitochondria was due to the degradation of Ferritin by DFO-induced autophagy, which was essential for DFO-induced increase in cell epithelial mesenchymal transition and cell migration.

收稿日期: 2023-03-08。

基金项目: 国家自然科学基金 (81571729, 82072085)。

作者简介: 杜佩珊 (1998—), 女, 四川省成都市人, 硕士研究生, 从事肿瘤学研究工作。

通信作者: 刘苹, 女, 教授, 博士生导师, 电话 (Tel.): 021-62933231, E-mail: pingliu@sjtu.edu.cn。

Moreover, the increased level of mitochondrial calcium uniporter (MCU) and mitoferrin1(Mfml1) might be involved in the DFO-induced increase of iron content in mitochondria. The study provides a research base for exploring new approaches to target iron metabolism for triple negative breast cancer in the clinic.

**【Key words】** Deferoxamine (DFO); Autophagy; Iron; Triple Negative Breast Cancer

## 0 引言

癌细胞转移是造成乳腺癌患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。与正常细胞相比,乳腺癌细胞中铁代谢异常,这可能会促进肿瘤的发生和转移<sup>[2]</sup>。铁是一种重要的无机金属元素,是参与核酸代谢和修复及细胞周期进程的多种蛋白质的关键组成成分,对细胞的增殖、生长和代谢至关重要<sup>[3]</sup>。然而,过量的铁积累会导致 DNA 氧化损伤,对细胞的正常活性有剧毒,因此,铁的稳态代谢对维持细胞正常的生理功能尤为重要<sup>[4]</sup>。在正常生理状态下,转铁蛋白(Transferrin, Tf)通过与其受体(TfR1)结合,将循环中的铁运送到细胞内。二价金属离子转运蛋白 1(DMT1)位于细胞膜表面,主要参与细胞外亚铁离子的运输<sup>[5]</sup>。利用后的铁或细胞内储存的过量铁可以通过铁泵蛋白(Ferroportin, FPN)排出细胞。FPN 是目前哺乳动物体内唯一已知的铁外排蛋白,在维持细胞铁稳态方面具有关键作用<sup>[6]</sup>。

肿瘤的主要特征之一是肿瘤细胞过度增殖,这使它们比正常的细胞更依赖铁元素<sup>[4]</sup>。乳腺癌细胞中的铁代谢失调反映在铁调节蛋白表达的改变上。TfR1 在乳腺癌细胞系和人类乳腺癌样本中都高度表达,而 FPN 在乳腺癌细胞系和人类乳腺癌样本中表达下调<sup>[7,8]</sup>。铁吸收的增加与外流的减少导致铁在乳腺癌细胞中过量积累。研究表明,乳腺癌组织中铁储存蛋白(Ferritin)的水平和铁浓度明显高于正常乳腺组织<sup>[9-13]</sup>。铁超载可能诱导肿瘤的发生,促进肿瘤的增殖与转移,导致新生血管的形成,也与乳腺癌细胞获得更强的恶性表型高度相关。因此,使用铁螯合剂或 TfR1 阻断抗体调控铁代谢已成为肿瘤治疗的重要方式<sup>[14]</sup>。

铁螯合剂最初被用于治疗铁超载性疾病,如骨髓增生异常综合征、再生障碍性贫血等。有研究表明,铁螯合剂已成为干预肿瘤发展和远端转移的有效策略<sup>[15]</sup>。铁螯合剂可以通过诱导细胞周期停滞、促进细胞凋亡来抑制细胞增殖,并同时参与抑制血管生成,从而抑制肿瘤转移<sup>[16]</sup>。去铁胺(Deferoxamine, DFO)对铁具有极高的亲和力,是第一个被用于治疗恶性肿

瘤的铁螯合剂<sup>[17]</sup>。DFO 可以抑制多种肿瘤细胞的增殖,如乳腺癌细胞、肝癌细胞等<sup>[18-20]</sup>。然而,DFO 诱导的铁耗竭也被报道具有促进缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)表达的作用,从而促进肿瘤转移<sup>[21,22]</sup>。本课题组以前的研究也表明,DFO 通过激活 TNBC 乳腺癌细胞系中的 IL-6/PI3K/AKT 途径上调细胞内的铁含量,并通过增强 TNF- $\alpha$  依赖性的 NF- $\kappa$ B 信号传导和 TGF- $\beta$  信号传导,使 TNBC 细胞具有更强的细胞迁移能力<sup>[23,24]</sup>。此外,DFO 也能促进线粒体内铁含量的增加<sup>[23]</sup>。有文献报道,线粒体在铁代谢中起核心作用,细胞内的铁会被运送到线粒体以用于辅因子的合成、DNA 的合成和修复,以及其他各种细胞生命活动<sup>[25]</sup>。然而,目前对于经过 DFO 处理后高度侵袭性乳腺癌细胞线粒体内铁含量增加的机制仍不清楚。

细胞中的铁以无毒的形式储存在铁蛋白中,铁蛋白最多能储存 4500 个铁原子<sup>[26]</sup>。在缺铁的条件下,铁蛋白在溶酶体中通过自噬途径被降解,该过程被称为铁自噬<sup>[26]</sup>。核受体共激活因子 4(NCOA4)是铁自噬的重要蛋白,它与铁蛋白结合并将其递送至溶酶体内以完成降解<sup>[26]</sup>。然而,目前尚不清楚 DFO 诱导的线粒体中铁含量的增加和细胞迁移能力的增强是否依赖自噬。

本研究使用三阴性乳腺癌细胞系(MDA-MB-231 细胞)和 ER $\alpha$  阳性乳腺癌细胞系(MCF-7 细胞)作为细胞模型,探究经过 DFO 处理,线粒体铁增加的机制。本研究揭示了 DFO 诱导的自噬是导致铁蛋白降解的重要机制,从而促进线粒体内铁的积累,上调铁含量,并促进上皮-间质转化相关蛋白的表达,最终增强细胞的迁移和侵袭能力。因此,联合使用自噬抑制剂能有效缓解由 DFO 治疗导致的三阴性乳腺癌细胞上皮-间质转化和迁移增多,并可以作为未来治疗乳腺癌的新方案。

## 1 实验材料和实验方法

### 1.1 细胞培养

非侵袭性 ER $\alpha$  阳性乳腺癌细胞系(MCF-7 细胞)

和侵袭性三阴性乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231 细胞) 购于美国标准生物制品收藏中心, 用含有 10% FBS (胎牛血清, Gemini, 加利福尼亚州, 美国) 和 100 活力单位/mL 青霉素及 0.1mg/mL 链霉素 (Hyclone, 犹他州, 美国) 的 DMEM 培养基 (Cytiva, 马萨诸塞州, 美国) 培养。细胞培养于 37°C 的具有 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿环境。

## 1.2 全细胞蛋白提取

肿瘤细胞用 10 $\mu$ M 氯喹 (CQ, Sigma, 密苏里州, 美国) 预处理 1 小时, 随后用 200 $\mu$ M DFO (Sigma, 密苏里州, 美国) 处理 24 小时。将收集到的细胞在含有 1mM 苯甲基磺酰氟 (Phenylmethylsulfonyl Fluoride, PMSF) 的 RIPA 裂解缓冲液 (Millipore, 马萨诸塞州, 美国) 中裂解, 添加蛋白酶抑制剂和磷酸化酶抑制剂。离心后, 收集上清液, 用 BCA 蛋白检测试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, 马萨诸塞州, 美国) 测定蛋白浓度。

## 1.3 线粒体和线粒体蛋白提取

收集肿瘤细胞, 用线粒体提取试剂盒 (碧云天, 上海, 中国) 提取线粒体。简言之, 将肿瘤细胞重悬于添加了 1mM PMSF 的线粒体分离试剂中, 冰浴 10~15 分钟。将细胞悬液转移至匀浆器中进行研磨, 用台盼蓝染色液鉴定匀浆效果。处理好的细胞悬液在 800g、4°C 的条件下离心 10 分钟。随后收集上清液, 在 11000g、4°C 的条件下离心 10 分钟, 弃上清液, 收集沉淀部分。随后使用线粒体裂解液 (碧云天, 上海, 中国) 提取线粒体蛋白。向收集的线粒体样品中加入含 1mM PMSF 的线粒体裂解液, 获得线粒体蛋白, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。

## 1.4 Western Blot

将全细胞蛋白和线粒体蛋白调整为相同浓度后添加上样缓冲液, 随后用 10% 或 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶对全细胞蛋白和线粒体蛋白进行凝胶电泳, 并转移到聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene Difluoride, PVDF, millipore, 马萨诸塞州, 美国) 膜上, 使用 BSA 进行封闭。使用 Ferritin、LC3-2、Fibronectin、Vimentin、TfR1、DMT1、Mfn1 (Abcam, 上海, 中国)、MCU (Novus, 科罗拉多州, 美国)、GAPDH 和 Actin (碧云天, 上海, 中国) 进行一抗孵育, 并使用 HRP 标记的二抗 (KPL, 马萨诸塞州, 美国) 和化学发光检测试剂盒 (雅酶, 上海, 中国) 进行蛋白分析。

## 1.5 细胞划痕实验

为了进行细胞划痕实验, 将  $3 \times 10^5$  个细胞接种在 6 孔板中, 当细胞生长至 70%~80% 时, 用 200 $\mu$ L 枪头沿着灭过菌的直尺与所画直线垂直的方向划下。用 PBS 去除脱落的细胞, 重复 3 次。用 10 $\mu$ M 氯喹预处理细胞 1 小时, 然后在含 1% FBS 的 DMEM 中加入 200 $\mu$ M DFO 处理 24 小时。使用倒置显微镜 (Leica DMBI3000 B, 黑森州, 德国) 的 5 倍物镜在划痕后 0 小时和 24 小时获取图像。随后使用 ImageJ 分析 0 小时和 24 小时对应划痕宽度的变化并统计。

## 1.6 细胞迁移实验

使用无血清培养基重悬细胞, 调整细胞悬液为  $3 \times 10^5$  个/mL。在 8  $\mu$ m 孔径的 Transwell 系统 (Corning, 纽约州, 美国) 的上室加入 100 $\mu$ L 细胞悬液, 在下室加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养基, 在 37°C 的温度下孵育过夜, 使细胞贴壁。移除 Transwell 小室内的细胞培养基, 首先用含 10 $\mu$ M CQ 的培养基预处理细胞 1 小时, 然后加入 200 $\mu$ M DFO 处理 24 小时。移除小室内的培养基, 用棉签擦洗残留在小室顶部的细胞。用 PBS 洗涤 3 次后, 用 4% 甲缩醛固定迁移到下室的细胞。10 分钟后弃去多聚甲醛, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后用结晶紫染色。使用正置显微镜 (Leica DM2500, 黑森州, 德国) 的 5 倍物镜获取图像。最后使用 33% 乙酸洗脱结晶紫, 用酶标仪测定 OD540, 量化迁移的细胞。

## 1.7 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 分析

使用 PBS 或氯喹预处理 MDA-MB-231 细胞 1 小时后, 加入 PBS 或 DFO 处理 24 小时。进行 3 次独立实验, 收获细胞样品并使用细胞计数器 (Nexcelom Bioscience, 马萨诸塞州, 美国) 计数。细胞和线粒体在室温下用 70% 的硝酸 (Sigma, 密苏里州, 美国) 消解过夜, 然后用 ddH<sub>2</sub>O 稀释。细胞样品的总铁含量使用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) (Thermo Fisher Scientific, 马萨诸塞州, 美国) 测定。

## 1.8 线粒体 Fe<sup>2+</sup>检测实验

将  $5 \times 10^4$  个细胞接种于共聚焦皿 (Squarix, 北莱茵-威斯特法伦州, 德国) 中, 在其生长至 70%~80% 时, 移除细胞培养基, 使用浓度为 0.5 $\mu$ M 的罗丹明 B-[ (1,10-菲罗啉-5-基)-氨基羰基 ] 苄酯 (RPA, Squarix, 北莱茵-威斯特法伦州, 德国) 在 37°C 条件下染色 20 分钟。用 HBSS 缓冲液 (碧云天, 上海, 中国) 洗涤

后,通过激光扫描共聚焦显微镜 (Leica TCS SP5, 黑森州, 德国)对细胞线粒体进行拍照检测,使用 ImageJ 分析 RPA 红色荧光强度。

### 1.9 统计分析

结果为至少 3 次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。使用 GraphPad Prism 7.0 软件 (GraphPad, 加利福尼亚州, 美国)对实验数据进行 Student's t 检验。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义 (\* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ )。

## 2 实验结果

### 2.1 DFO 处理促进了 MDA-MB-231 细胞的铁摄取

本课题组以前的研究表明,经过 DFO 处理, MCF-7 细胞中铁含量下降,相反,MDA-MB-231 细胞中铁含量明显上调<sup>[24]</sup>。细胞内铁摄取的增多可能是导致铁含量上调的原因。因此,我们首先使用 Western Blot 技术探究经过 DFO 处理后 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系内铁摄取蛋白 TfR1 与 DMT1 表达水平的差异。与对照组 (经过 PBS 处理) 相比,经过 DFO 处理, TfR1 的表达水平在 MDA-MB-231 细胞和 MCF-7

细胞中都明显上调 [见图 1 (a)、(b)]。重要的是,经过 DFO 处理, DMT1 的表达水平在 MDA-MB-231 细胞中增加,但在 MCF-7 细胞中减少 [见图 1 (a)、(c)]。此外,经过 DFO 处理, MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中 Ferritin 的表达水平都明显降低, MCF-7 细胞降至较 MDA-MB-231 细胞更低的水平 [见图 1 (a)、(d)]。以上数据表明, DFO 处理会导致 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞中的铁蛋白降解,但 MDA-MB-231 细胞可以通过上调 DMT1 的表达增强对铁的吸收能力。

### 2.2 DFO 诱导 MDA-MB-231 细胞的自噬作用

在缺铁条件下,铁蛋白能通过自噬途径在溶酶体中降解<sup>[27]</sup>。自噬体上 LC3-2 表达水平的上调是自噬的标志<sup>[28]</sup>。为了探究 DFO 是否通过诱导自噬来降解铁蛋白,本研究使用 Western Blot 技术测定了 LC3-2 的表达水平。结果显示,经过 DFO 处理, LC3-2 在 MDA-MB-231 细胞中的含量显著增加,但在 MCF-7 细胞中的含量减少 [见图 2 (a)、(b)]。这表明, DFO 诱导了 MDA-MB-231 细胞而不是 MCF-7 细胞的自噬。

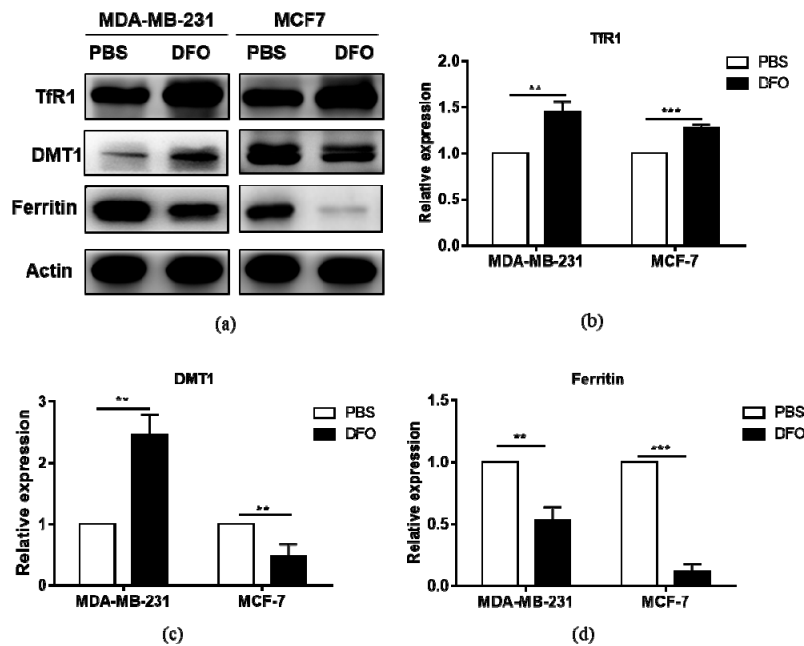


图 1 DFO 处理后 TfR1、DMT1 和 Ferritin 的表达水平

Fig. 1 Expression levels of TfR1, DMT1 and Ferritin after DFO treatment

(a) Western Blot 检测 DFO 处理后 TfR1、DMT1 和 Ferritin 表达量代表图; (b) DFO 处理后 TfR1 表达灰度值统计图;

(c) DFO 处理后 DMT1 表达灰度值统计图; (d) DFO 处理后 Ferritin 表达灰度值统计图

(a) Representative graph of TfR1, DMT1 and Ferritin expression after DFO treatment by Western Blot; (b) Statistical graph of grayscale values of TfR1 expression after DFO treatment; (c) Statistical graph of grayscale values of DMT1 expression after DFO treatment;

(d) Statistical graph of grayscale values of Ferritin expression after DFO treatment

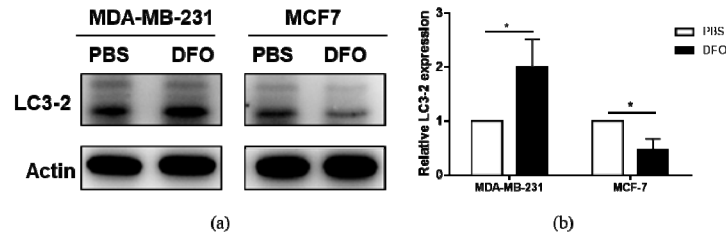


图 2 DFO 处理后 LC3-2 的表达水平

Fig. 2 Expression level of LC3-2 after DFO treatment

(a) Western Blot 检测 DFO 处理后 LC3-2 表达量代表图；(b) DFO 处理后 LC3-2 表达灰度值统计图

(a) Representative graph of LC3-2 expression after DFO treatment by Western Blot;

(b) Statistical graph of gray scale values of LC3-2 expression after DFO treatment

### 2.3 DFO 诱导的自噬作用促进了铁蛋白的降解

为进一步探究 MDA-MB-231 细胞中铁蛋白降解与自噬之间的关系，本研究在使用 DFO 之前用氯喹 (CQ) 预处理细胞。氯喹是一种自噬抑制剂，通过上调溶酶体中的 pH 值，下调酸性水解酶的活性，从而抑制细胞内自噬溶酶体的降解<sup>[27]</sup>。与预期相符，相比 PBS 对照组，氯喹预处理后 MDA-MB-231 细胞中的 LC3-2 水平显著上调 [见图 3 (a)、(b)]。此外，与单独的 DFO 处理组相比，氯喹预处理后再使用 DFO

会显著上调 LC3-2 的水平 [见图 3 (a)、(b)]，这表明氯喹可以有效抑制自噬。和 PBS 对照组相比，单独使用氯喹并不改变 Ferritin 的表达水平 [见图 3 (c)、(d)]，单独使用 DFO 处理降低了 Ferritin 的含量 [见图 3 (c)、(d)]。然而，与单独使用 DFO 处理相比，氯喹联合 DFO 处理显著增加了 Ferritin 的表达 [见图 3 (c)、(d)]。以上结果表明，DFO 通过诱导 MDA-MB-231 细胞的自噬，促进了铁蛋白的降解。

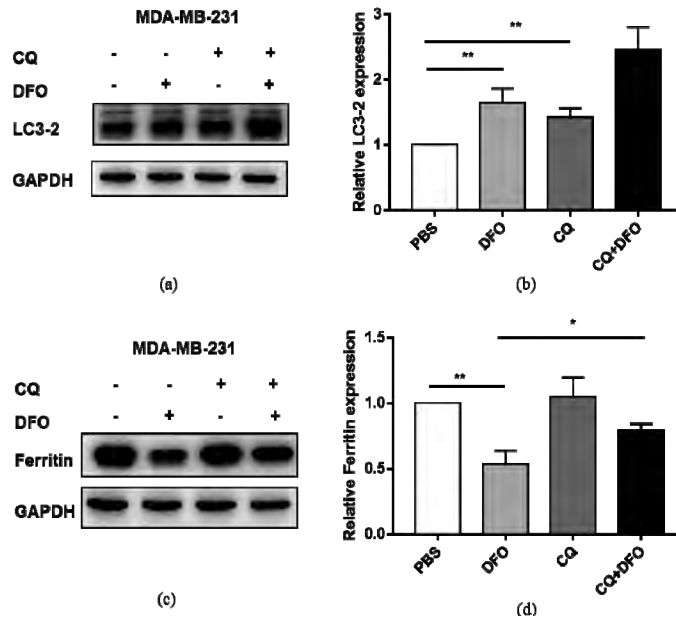


图 3 自噬抑制剂氯喹抑制了 DFO 诱导的铁蛋白的降解

Fig. 3 Autophagy inhibitors CQ inhibited DFO-induced degradation of Ferritin

(a) Western Blot 检测 CQ 和 DFO 处理后 LC3-2 表达量代表图；(b) CQ 和 DFO 处理后 LC3-2 表达灰度值统计图；

(c) Western Blot 检测 CQ 和 DFO 处理后 Ferritin 表达量代表图；(d) CQ 和 DFO 处理后 Ferritin 表达灰度值统计图

(a) Representative graph of LC3-2 expression after CQ and DFO treatment by Western Blot; (b) Statistical graph of grayscale values of LC3-2 expression after CQ and DFO treatment; (c) Representative graph of Ferritin expression after CQ and DFO treatment by Western Blot;

(d) Statistical graph of grayscale values of Ferritin expression after CQ and DFO treatment

#### 2.4 DFO 诱导的铁蛋白自噬导致细胞内和线粒体内的铁含量增加

铁蛋白中的铁在自噬后被降解，重新释放至细胞内，形成不稳定铁池 (Labile Iron Pool, LIP) [29]。LIP 中的铁可以用于细胞代谢，过量的铁可以储存在铁蛋白中或被运送到线粒体内 [25]。本课题组在以前的研究中发现，DFO 处理显著诱导了 MDA-MB-231 细胞线粒体内铁含量的上调 [23]。本研究发现 DFO 处理导致铁蛋白含量降低。本研究假设 DFO 通过诱导自噬促进铁蛋白降解，该过程中释放出的铁进入线粒体内，最终导致线粒体内铁含量的增加。为验证该猜想，本研究使用 ICP-MS 分别测定了氯喹和经过 DFO 处理后三阴性乳腺癌细胞内与线粒体内的铁含量。与经过 PBS 处理的对照组相比，经过 DFO 处理，MDA-MB-231 细胞的线粒体内和细胞内的铁含量都显著上调 [见图 4 (a)、(b)]。单独氯喹处理在一定程度上降低了细

胞中的铁含量，但并不影响线粒体内的铁含量 [见图 4 (a)、(b)]。有趣的是，氯喹预处理完全消除了 DFO 诱导的铁含量增加 [见图 4 (a)、(b)]。

RPA 是线粒体中  $\text{Fe}^{2+}$  的特异性探针，线粒体中的  $\text{Fe}^{2+}$  可以使其荧光淬灭，因此线粒体内的  $\text{Fe}^{2+}$  水平可以通过检测探针荧光的强弱来表征 [30]。本研究使用激光共聚焦显微镜检测了 MDA-MB-231 细胞中线粒体的 RPA 水平。结果显示，MDA-MB-231 细胞中线粒体的 RPA 荧光强度在经过 DFO 处理后显著降低，表明经过 DFO 处理，线粒体内  $\text{Fe}^{2+}$  含量显著增加 [见图 4(c)]。然而，与单独的 DFO 处理相比，氯喹预处理联合 DFO 显著增强了线粒体的 RPA 荧光强度，表明线粒体内铁含量降低 [见图 4(c)]，这说明氯喹预处理抑制了 DFO 诱导的线粒体内  $\text{Fe}^{2+}$  的增加。

以上结果表明，MDA-MB-231 细胞的线粒体内增加的铁来源于 DFO 诱导的铁蛋白自噬作用。

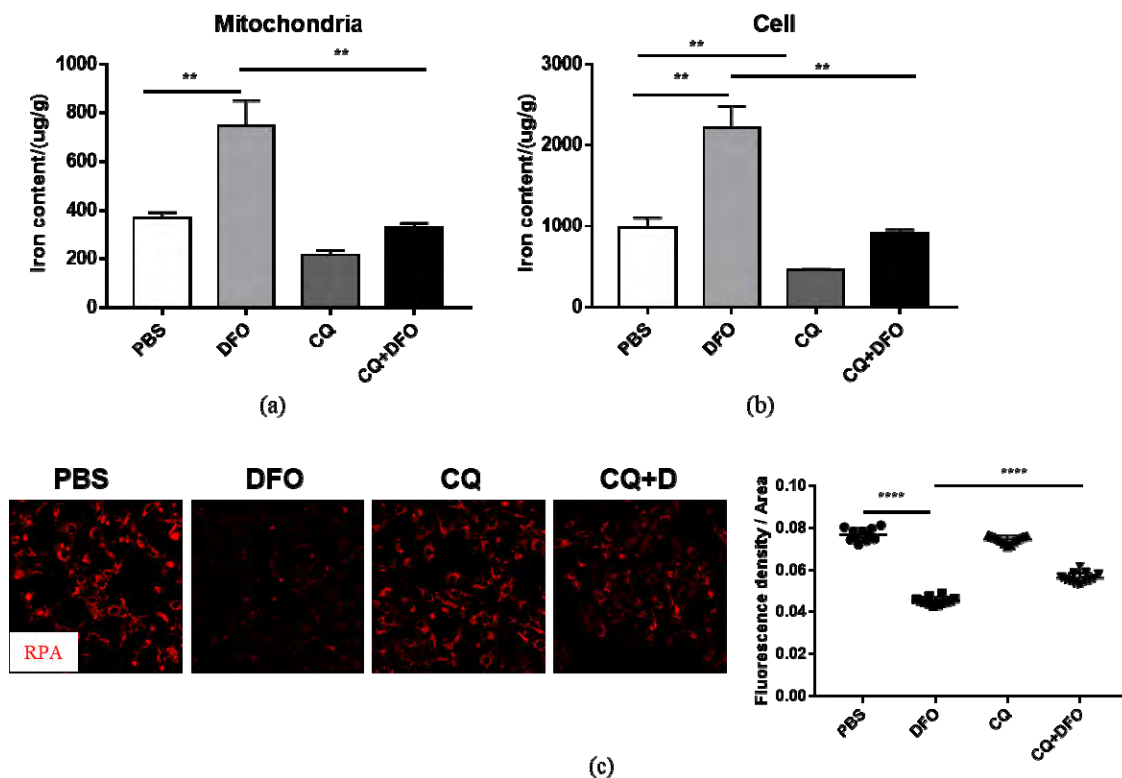


图 4 自噬抑制剂氯喹阻止了 DFO 诱导的细胞内和线粒体内铁含量的增加

Fig. 4 Autophagy inhibitors CQ prevented DFO-induced increased the intracellular and mitochondrial iron content

(a) ICP-MS 检测 MDA-MB-231 细胞线粒体内铁含量; (b) ICP-MS 检测 MDA-MB-231 细胞内铁含量;

(c) RPA 检测 MDA-MB-231 细胞线粒体内  $\text{Fe}^{2+}$  含量

(a) Mitochondrial iron contents in MDA-MB-231 cells were measured by ICP-MS;

(b) Cellular iron contents in MDA-MB-231 cells were measured by ICP-MS;

(c) Mitochondrial  $\text{Fe}^{2+}$  in MDA-MB-231 cells was measured by RPA

### 2.5 MCU 和 Mfn1 可能参与了经过 DFO 处理后铁从细胞质向线粒体的转运

线粒体钙离子单向转运蛋白 (Mitochondrial Calcium Uniporter, MCU) 和 Mfn1 是线粒体膜上的铁转运蛋白<sup>[25]</sup>。为了进一步探究细胞内的铁向线粒体中转移的机制,本研究分别收获了经 PBS 处理的对照

组或经 DFO 处理 24 小时后 MDA-MB-231 细胞的线粒体,并使用 Western Blot 技术检测线粒体上 MCU 和 Mfn1 的蛋白表达水平。结果显示,与经过 PBS 处理的对照组相比, DFO 处理显著上调了线粒体上 MCU 和 Mfn1 的表达 [见图 5 (a)、(b)],这表明 MCU 和 Mfn1 可能参与了铁从细胞质向线粒体的转运。

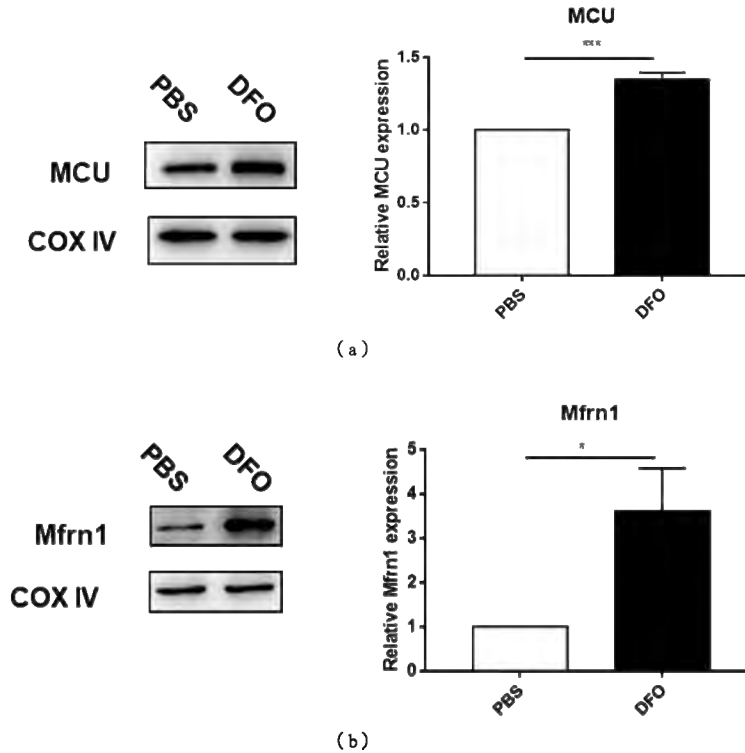


图 5 DFO 处理诱导 MCU 和 Mfn1 蛋白增加  
Fig. 5 DFO induced increase of MCU and Mfn1

(a) Western Blot 检测 DFO 处理后 MCU 含量; (b) Western Blot 检测 DFO 处理后 Mfn1 含量

(a) The content of MCU after DFO treatment was detected by Western Blot;

(b) The content of Mfn1 after DFO treatment was detected by Western Blot

### 2.6 DFO 诱导的铁蛋白自噬促进 MDA-MB-231 细胞上皮-间质转化和细胞迁移

本课题组之前的研究表明, DFO 能增强细胞对铁的吸收能力, 促进线粒体中铁的积累, 从而导致三阴性乳腺癌细胞系中间质表型细胞标志物的上调, 促进细胞迁移<sup>[24]</sup>。由于氯喹可以降低细胞和线粒体中的铁水平, 本研究进一步检测了氯喹预处理是否可以抑制 DFO 诱导的 MDA-MB-231 细胞的迁移能力。与之前的研究结果一致, DFO 处理显著诱导了间质表型细胞标记物的表达, 如纤维连接蛋白 (Fibronectin) 和波形

蛋白 (Vimentin)。与 PBS 对照组相比, 仅使用氯喹处理时, Fibronectin 和 Vimentin 的表达没有改变, 而氯喹预处理完全消除了 DFO 诱导的 Fibronectin 和 Vimentin 的表达增加 [见图 6 (a)]。这表明, DFO 诱导的自噬促进了 MDA-MB-231 细胞的上皮-间质转化, 并可以被氯喹逆转。

上皮-间质转化是肿瘤细胞从原发部位向继发部位迁移的重要生物学过程<sup>[31]</sup>。本研究通过细胞划痕实验进一步验证了 DFO 诱导的自噬对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响。DFO 处理增强了 MDA-MB-231

细胞的迁移能力 [见图 6 (b)]。而与单独 DFO 处理相比,氯喹预处理抑制了 DFO 诱导的 MDA-MB-231 细胞迁移的增强 [见图 6 (b)]。此外,本研究通过 Transwell 实验检测了 DFO 诱导的自噬对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响。与对照组相比, DFO 处理显著增强了细胞侵袭能力 [见图 6 (c)]。经过氯喹预处

理后, DFO 诱导的细胞侵袭能力明显减弱。此结果说明, DFO 诱导的自噬增强了三阴性乳腺癌细胞的迁移与侵袭能力 [见图 6 (c)]。以上结果表明, DFO 诱导的铁蛋白自噬促进了 MDA-MB-231 细胞的上皮-间质转化和细胞迁移能力,有助于三阴性乳腺癌的转移,这种作用可以被氯喹逆转。

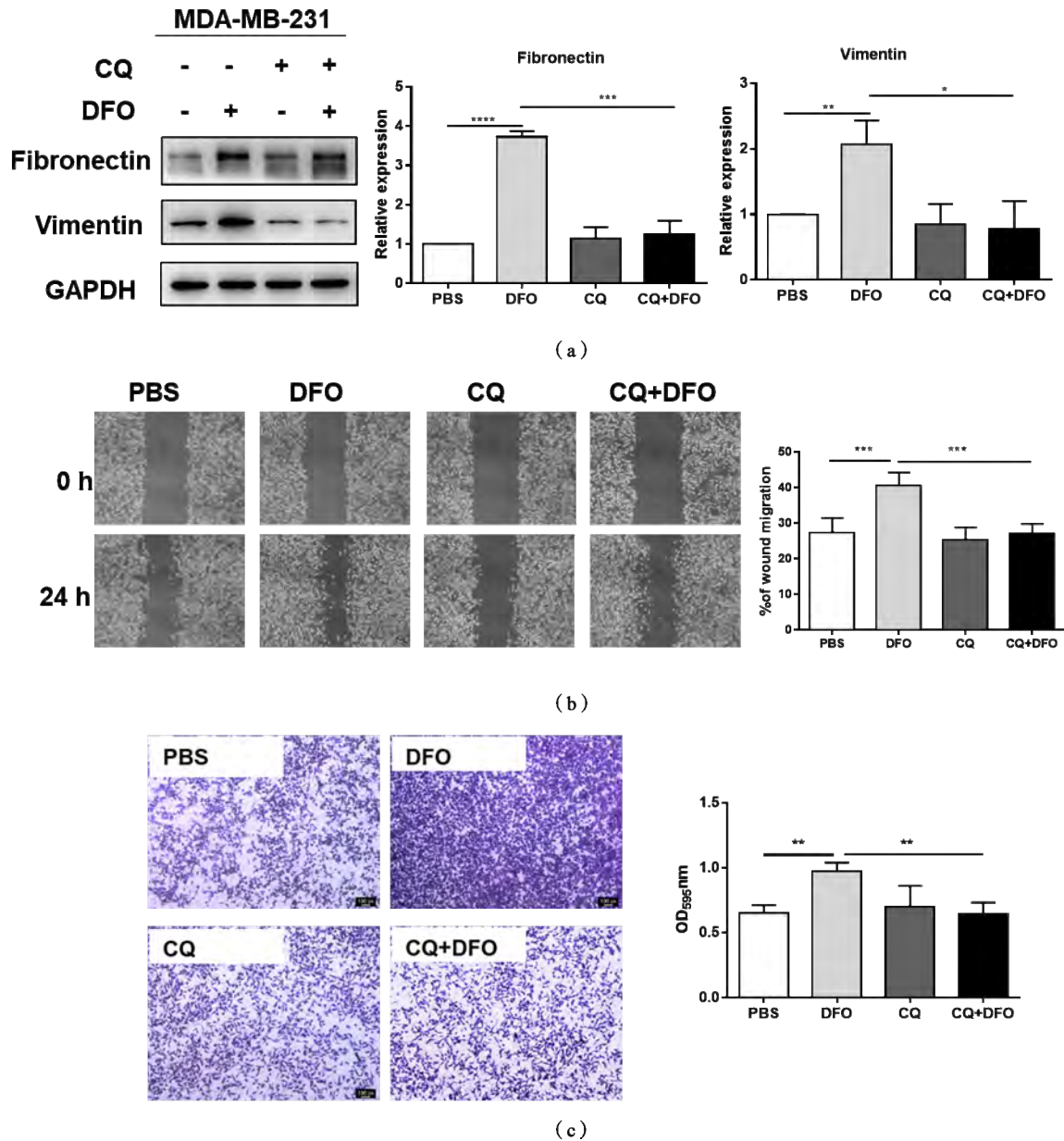


图 6 溶酶体抑制剂氯喹抑制 DFO 诱导的肿瘤细胞迁移和侵袭

Fig. 6 Lysosomal inhibitors CQ inhibited DFO-induced migration and invasion

(a) Western Blot 检测 Fibronectin 和 Vimentin 的表达水平; (b) 细胞划痕实验检测 MDA-MB-231 细胞的迁移;  
(c) Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭

(a) The expressions level of Fibronectin and Vimentin were detected by Western Blot;  
(b) Cell migration was measured by wound-healing assay; (c) Cell invasion was measured by Transwell assay



### 3 讨论

铁在调节肿瘤微环境和转移方面起着深远的作用。多种铁代谢相关蛋白已被证明参与恶性肿瘤的发生、增殖和转移<sup>[8]</sup>。靶向铁代谢(如铁耗竭)具有有效和广泛的抗肿瘤作用,这使其成为肿瘤药物研发的潜在靶点。一些铁螯合剂已被纳入临床评估,用于治疗恶性肿瘤<sup>[32]</sup>。DFO 是一种铁螯合剂,可以抑制多种肿瘤的增殖<sup>[18, 19]</sup>。然而,近年来一些研究发现,在部分恶性肿瘤中,DFO 可以促进肿瘤细胞的增殖和迁移能力<sup>[33-35]</sup>,如结直肠癌细胞、胶质母细胞瘤细胞和三阴性乳腺癌细胞。在机制上,DFO 诱导的铁耗竭会激活 HIF-1 通路并诱导基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的表达,从而通过降解细胞外基质来增强转移能力<sup>[36]</sup>。此外,本研究发现,DFO 虽然可以消耗非侵袭性乳腺癌细胞系(MCF-7)内的铁,但会促进侵袭性乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)细胞内和线粒体内铁的积累,从而促进 TNBC 细胞的迁移和侵袭。然而,目前对 DFO 诱导的 MDA-MB-231 细胞内和线粒体内铁积累的机制尚不清楚。

在缺铁条件下,铁蛋白可以通过自噬在溶酶体内降解<sup>[27, 37]</sup>。本研究发现,在 MDA-MB-231 细胞中,DFO 诱导的线粒体中铁的增加来源于自噬降解的铁蛋白,从而促进了三阴性乳腺癌细胞的迁移和侵袭。经 DFO 处理后,MDA-MB-231 细胞中的 LC3-2 表达增加,而 MCF-7 细胞中的 LC3-2 表达减少,这表明 DFO 促进了 MDA-MB-231 细胞而非 MCF-7 细胞的自噬。本研究发现,经 DFO 处理后,MCF-7 细胞中的铁含量降低,其铁蛋白的表达接近检测下限,而 MDA-MB-231 细胞中铁蛋白的表达仅为对照组的一半。MCF-7 细胞中自噬水平的降低可能是由经 DFO 处理后铁蛋白水平迅速降低导致的,但在 MDA-MB-231 细胞中,DFO 诱导的铁自噬可能通过加速铁代谢上来上调细胞内的铁含量。

铁蛋白是一种通用的细胞内蛋白,可储存并释放铁。自噬通过降解铁蛋白在维持铁平衡方面起着重要的作用<sup>[38]</sup>。本研究发现,在 MDA-MB-231 细胞中,DFO 处理会诱导自噬增加,从而促进铁蛋白降解,上调线粒体内铁的含量。但目前仍不清楚铁蛋白降解后铁是如何进入线粒体的。铁蛋白被 DFO 降解后所释放的铁可以返回到 LIP<sup>[29]</sup>,并通过多种机制从线粒体外

膜转移到线粒体间隙<sup>[25]</sup>,然后通过 Mfn1 和 Mfn2 转运到线粒体内膜,随后到达线粒体基质<sup>[39, 40]</sup>。MCU 是大脑<sup>[41-43]</sup>、心脏<sup>[44]</sup>和肝脏<sup>[45, 46]</sup>中的铁进入线粒体的主要途径。本研究探讨了 DFO 处理后线粒体中 MCU 和 Mfn1 的表达水平,发现 DFO 具有诱导线粒体内 MCU 和 Mfn1 表达的作用,这表明其可能参与了 DFO 诱导的线粒体内铁含量的增加。铁进入线粒体的具体方式仍有待进一步研究。

鉴于铁在肿瘤细胞增殖中的关键作用,铁螯合剂可以作为一种有前景的抗肿瘤药物<sup>[47, 48]</sup>。针对部分高侵袭性肿瘤类型,如三阴性乳腺癌等,铁螯合剂可能通过增加自噬作用促进了肿瘤细胞的迁移能力。因此,针对这类高侵袭性肿瘤,自噬抑制剂(如氯喹)与铁螯合剂(如 DFO)的联合使用可能是抑制自噬诱导的肿瘤转移的潜在治疗方法。

#### 参考文献

- [1] KIM MY, Breast Cancer Metastasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1187: 183-204.
- [2] BASULI DL, TESFAY L, DENG Z, *et al*. Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(29): 4089-4099.
- [3] KAZAN HH, URFALI-MAMATOGLU C, GUNDUZ U. Iron metabolism and drug resistance in cancer[J]. *Biometals*, 2017, 30(5): 629-641.
- [4] MORALES M, XUE X. Targeting iron metabolism in cancer therapy[J]. *Theranostics*, 2021, 11(17): 8412-8429.
- [5] CHIFMAN J, Laubenbacher R, TORTI SV. A systems biology approach to iron metabolism[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 844: 201-25.
- [6] GU Z, WANG H, XIA J, *et al*. Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2211-21.
- [7] DANIELS, TR, BERNABEU E, RODRIGUEZ JA, *et al*. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer[J]. *Bba-Gen Subjects*, 2012, 1820(3): 291-317.
- [8] TORTI SV, TORTI FM. Iron and cancer: more ore to be mined[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13(5): 342-355.
- [9] WEINSTEIN RE, BOND BH, SILBERBERG BK. Tissue ferritin concentration in carcinoma of the breast[J]. *Cancer*, 1982, 50(11): 2406-2409.
- [10] GUNER G, KIRKALI G, YENISEY C, *et al*. Cytosol and serum

- ferritin in breast-carcinoma[J]. **Cancer Letters**, 1992, 67(2-3): 103-112.
- [11] ELLIOTT RL, ELLIOTT MC, WANG F, *et al.* Breast carcinoma and the role of iron metabolism. A cytochemical, tissue culture, and ultrastructural study[J]. **Ann N Y Acad Sci**, 1993, 698: 159-66.
- [12] DUAN X, HE K, LI J, *et al.* Tumor associated macrophages deliver iron to tumor cells via Lcn2[J]. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, 2018, 10(2): 105-114.
- [13] MAJEWSKA U, BANAS D, BRAZIEWICZ J, *et al.* Trace element concentration distributions in breast, lung and colon tissues[J]. **Phys Med Biol**, 2007, 52(13): 3895-911.
- [14] LIN L, CHEN H, ZHAO R, *et al.* Nanomedicine targets iron metabolism for cancer therapy[J]. **Cancer Sci**, 2022, 113(3): 828-837.
- [15] ZHOU J, JIANG Y, ZHAO J, *et al.* Dp44mT, an iron chelator, suppresses growth and induces apoptosis via RORA-mediated NDRG2-IL6/JAK2/STAT3 signaling in glioma[J]. **Cell Oncol (Dordr)**, 2020, 43(3): 461-475.
- [16] CORCE V, GOUIN SG, RENAUD S, *et al.* Recent advances in cancer treatment by iron chelators[J]. **Bioorg Med Chem Lett**, 2016, 26(2): 251-256.
- [17] MERLOT AM, KALINOWSKI DS, RICHARDSON DR. Novel chelators for cancer treatment: where are we now?[J]. **Antioxid Redox Signal**, 2013, 18(8): 973-1006.
- [18] FRYKNAS M, ZHANG XN, BREMBERG U, *et al.* Iron chelators target both proliferating and quiescent cancer cells[J]. **Sci Rep-Uk**, 2016, 6.
- [19] SALIS O, BEDIR A, KILINC V, *et al.* The anticancer effects of desferrioxamine on human breast adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma cells[J]. **Cancer Biomark**, 2014, 14(6): 419-426.
- [20] YU Y, GUTIERREZ E, KOVACEVIC Z, *et al.* Iron chelators for the treatment of cancer[J]. **Curr Med Chem**, 2012, 19(17): 2689-702.
- [21] DONGIOVANNI P, VALENTI L, LUDOVICA FRACANZANI A, *et al.* Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver[J]. **Am J Pathol**, 2008, 172(3): 738-47.
- [22] WANG Y, YU L, DING J, *et al.* Iron metabolism in cancer[J]. **Int J Mol Sci**, 2018, 20(1).
- [23] CHEN CL, WANG SC, LIU P. Deferoxamine enhanced mitochondrial iron accumulation and promoted cell migration in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells via a ROS-dependent mechanism[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019, 20(19).
- [24] LIU P, HE K, SONG H, *et al.* Deferoxamine-induced increase in the intracellular iron levels in highly aggressive breast cancer cells leads to increased cell migration by enhancing TNF-alpha-dependent NF-kappaB signaling and TGF-beta signaling[J]. **J Inorg Biochem**, 2016, 160: 40-8.
- [25] PAUL BT, MANZ DH, TORTI SV. Mitochondria and iron: current questions (vol 10, pg 65, 2017)[J]. **Expert Rev Hematol**, 2017, 10(3): 275-275.
- [26] MANZ DH, BLANCHETTE NL, PAUL BT, *et al.* Iron and cancer: recent insights[J]. **Ann N Y Acad Sci**, 2016, 1368(1): 149-61.
- [27] AROSIO P, ELIA L, POLI M. Ferritin, cellular iron storage and regulation[J]. **Iubmb Life**, 2017, 69(6): 414-422.
- [28] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, *et al.* LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. **Embo J**, 2003, 22(17): 4577-4577.
- [29] LA A, NGUYEN T, TRAN K, *et al.* Mobilization of iron from ferritin: new steps and details[J]. **Metallomics**, 2018, 10(1): 154-168.
- [30] RAUEN U, SPRINGER A, WEISHEIT D, *et al.* Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities[J]. **ChemBiochem**, 2007, 8(3): 341-52.
- [31] SAXENA K, JOLLY MK, BALAMURUGAN K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis[J]. **Transl Oncol**, 2020, 13(11): 100845.
- [32] WEBER S, PARMON A, KURRLE N, *et al.* The clinical significance of iron overload and iron metabolism in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia[J]. **Front Immunol**, 2020, 11: 627662.
- [33] LIU YP, CUI YF, SHI M, *et al.* Deferoxamine promotes MDA-MB-231 cell migration and invasion through increased ROS-Dependent HIF-1 alpha accumulation[J]. **Cell Physiol Biochem**, 2014, 33(4): 1036-1046.
- [34] ZHANG WJ, WU Y, YAN QQ, *et al.* Deferoxamine enhances cell migration and invasion through promotion of HIF-1 alpha expression and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. **Oncol Rep**, 2014, 31(1): 111-116.
- [35] ELSTNER A, HOLTKAMP N, von DEIMLING A. Involvement of Hif-1 in desferrioxamine-induced invasion of glioblastoma cells[J]. **Clin Exp Metastasis**, 2007, 24(1): 57-66.
- [36] TSAI SH, HUANG PH, HSU YJ, *et al.* Inhibition of hypoxia inducible factor-1 alpha attenuates abdominal aortic aneurysm progression through the down-regulation of matrix metalloproteinases[J]. **Sci Rep-Uk**, 2016, 6.
- [37] ASANO T, KOMATSU M, YAMAGUCHI-IWAI Y, *et al.* Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells[J]. **Mol Cell Biol**, 2011, 31(10): 2040-2052.

- [38] KRISHAN S, JANSON PJ, GUTIERREZ E, *et al.* Iron metabolism and autophagy: a poorly explored relationship that has important consequences for health and disease[J]. **Nagoya J Med Sci**, 2015, 77(1-2): 1-6.
- [39] ZEIDAN RS, HAN SM, LEEUWENBURGH C, *et al.* Iron homeostasis and organismal aging[J]. **Ageing Res Rev**, 2021, 72.
- [40] PARADKAR PN, ZUMBRENNEN KB, PAW BH, *et al.* Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2[J]. **Mol Cell Biol**, 2009, 29(4): 1007-1016.
- [41] SRIPETCHWANDEE J, SANIT J, CHATTIPAKORN N, *et al.* Mitochondrial calcium uniporter blocker effectively prevents brain mitochondrial dysfunction caused by iron overload[J]. **Life Sci**, 2013, 92(4-5): 298-304.
- [42] YAN HY, HAO SY, SUN XY, *et al.* Blockage of mitochondrial calcium uniporter prevents iron accumulation in a model of experimental subarachnoid hemorrhage[J]. **Biochem Bioph Res Co**, 2015, 456(4): 835-840.
- [43] ZHANG L, WANG HD, ZHOU XM, *et al.* Role of mitochondrial calcium uniporter-mediated  $Ca^{2+}$  and iron accumulation in traumatic brain injury[J]. **J Cell Mol Med**, 2019, 23(4): 2995-3009.
- [44] SRIPETCHWANDEE J, KENKNIGHT SB, SANIT J, *et al.* Blockade of mitochondrial calcium uniporter prevents cardiac mitochondrial dysfunction caused by iron overload[J]. **Acta Physiol**, 2014, 210(2): 330-341.
- [45] HU JT, LEMASTERS JJ. Suppression of iron mobilization from lysosomes to mitochondria attenuates liver injury after acetaminophen overdose in vivo in mice: Protection by minocycline[J]. **Toxicol Appl Pharm**, 2020, 392.
- [46] ZHANG X, LEMASTERS JJ. Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during ischemia predisposes to injury after reperfusion in rat hepatocytes[J]. **Free Radical Bio Med**, 2013, 63: 243-253.
- [47] TORTI SV, TORTI FM. Iron and cancer: 2020 vision[J]. **Cancer Research**, 2020, 80(24): 5435-5448.
- [48] TORTI SV, MANZ DH, PAUL BT, *et al.* Iron and Cancer[J]. **Annu Rev Nutr**, 2018, 38: 97-125.