

• 基础研究 •

## 膜联蛋白 ANXA5 调节黑色素瘤细胞铁死亡及其机制研究

王嘉慧, 李璐琪, 张悦, 张肖文, 张晶\*

南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210023

**[摘要]** 目的: 探究黑色素瘤中膜联蛋白 A5 (annexin A5, ANXA5) 表达与铁死亡的相关性。方法: 利用 The Human Protein Atlas 数据分析 ANXA5 在黑色素瘤中的表达情况, 并采用人黑色素瘤组织芯片进行免疫组化验证, 再以黑色素瘤细胞 B16F10 为研究对象, 通过 CRISPR-Cas9 技术构建 ANXA5 敲除株, 通过 CCK-8 及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测敲除 ANXA5 对 B16F10 铁死亡效应的影响, 进一步通过 RNA-seq 寻找 ANXA5 调节铁死亡可能的靶分子并验证, 最后在不同的黑色素瘤细胞中检测内源性 ANXA5 表达水平, 并确认 ANXA5 对铁死亡敏感性的调节作用。结果: ANXA5 在黑色素瘤组织中异常高表达, 敲除或敲低 ANXA5 能促进黑色素瘤细胞对铁死亡的敏感性。酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 作为铁死亡关键调节分子, 与 ANXA5 表达呈负相关性, 过表达 ANXA5 能降低 ACSL4 水平, 表现出对铁死亡的抵抗性。结论: 在黑色素瘤细胞中, 敲低 ANXA5 能够上调 ACSL4 水平, 增强黑色素瘤细胞对铁死亡的敏感性, 提示 ANXA5 有望成为黑色素瘤铁死亡治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 黑色素瘤; 铁死亡; 膜联蛋白 A5; ACSL4

**[中图分类号]** R739.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2025)02-157-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240844

## Mechanisms of annexin A5 regulating ferroptosis sensitivity in melanoma cells

WANG Jiahui, LI Luqi, ZHANG Yue, ZHANG Xiaowen, ZHANG Jing\*

School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China

**[Abstract]** **Objective:** To explore the correlation between the expression of annexin A5 (ANXA5) and ferroptosis in melanoma. **Methods:** The expression of ANXA5 in melanoma was analyzed using The Human Protein Atlas data and further validated by immunohistochemistry on a human melanoma tissue microarray. The B16F10 melanoma cell line was used as the research model, where ANXA5 knockout cell lines were generated using CRISPR-Cas9 technology. The effect of ANXA5 knockout on ferroptosis in B16F10 cells was assessed using CCK-8 and lactate dehydrogenase (LDH) assays. RNA-seq was further performed to identify the possible target molecules of ANXA5 related to ferroptosis, followed by validation. Additionally, the endogenous expression of ANXA5 in different melanoma cell lines was measured to confirm its regulatory role in ferroptosis sensitivity. **Results:** ANXA5 was aberrantly overexpressed in melanoma tissues, and knockingdown or knockingout ANXA5 promoted the sensitivity to ferroptosis in melanoma cells. Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) as a key regulator of ferroptosis, was negatively correlated with ANXA5 expression. Overexpression of ANXA5 reduced the level of ACSL4 and showed resistance to ferroptosis. **Conclusion:** In melanoma cells, downregulation of ANXA5 enhanced the sensitivity to ferroptosis *via* upregulating ACSL4, suggesting that ANXA5 may be a potential target of ferroptosis-based therapy in melanoma.

**[Key words]** melanoma; ferroptosis; annexin A5; ACSL4

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(02): 157-164]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(32250016)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jzhang08@nju.edu.cn  
(ORCID: 0000-0003-3733-8104)

黑色素瘤是皮肤癌中死亡率最高的一种恶性肿瘤, 尤其是转移性黑色素瘤, 临床治疗效果很差, 5年生存率仅为10%, 对传统的放疗、化疗以及免疫调节药物的抵抗性强, 寻找治疗黑色素瘤转移的新

靶点和新策略是临床研究的重要课题。铁死亡是铁依赖性的、细胞内脂质过氧化引起的细胞死亡,作为一种程序性细胞死亡的新形式,不仅可以抑制肿瘤生长,在增强免疫治疗反应和克服癌症治疗耐药性上具有巨大潜力,已成为癌症治疗研究的热点<sup>[1-2]</sup>。最新研究表明,对传统治疗有抵抗力或有高转移倾向的癌症类型可能对铁死亡易感,尤其是恶性黑色素瘤具有较高RAS基因突变率,铁死亡诱导剂RSL3和Erastin对RAS突变的黑色素瘤细胞具有选择致死活性,铁死亡效应与肿瘤治疗疗效密切相关<sup>[3]</sup>。因此,探讨黑色素瘤细胞对铁死亡的防御机制,增强黑色素瘤细胞对铁死亡的易感性,将为靶向铁死亡治疗黑色素瘤提供可能的潜在靶点。

膜联蛋白A5(annexin A5, ANXA5)是一种钙离子依赖性的磷脂结合蛋白,能特异、高效地结合磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS),具有抗凝血、抗炎症,抗肿瘤等活性,并广泛应用于细胞凋亡检测和体内分子影像技术<sup>[4-7]</sup>。近年来,多项研究表明ANXA5在多种类型的肿瘤中异常表达,成为预测肿瘤发展的生物标志物,如结肠癌、肝癌、肾癌、乳腺癌等,在临床上对诊断、预后具有重要价值<sup>[8]</sup>。然而ANXA5在黑色素瘤中的表达及其生物学分子机制并不清楚。本研究探讨了ANXA5在黑色素瘤中的表达及其对铁死亡效应的影响,初步揭示其可能的调控机制,以期对黑色素瘤治疗提供新的潜在靶点,增强黑色素瘤的铁死亡易感性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠黑色素瘤细胞株B16F10、B16F1和人源黑色素瘤细胞A375由本实验室保存。黑色素瘤组织芯片编号MEL961(上海威奥生物科技有限公司);gRNA以及qPCR引物(南京金斯瑞生物科技股份有限公司);抗体ANXA5(#8555, CST公司,美国);酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)(ab155282, Abcam公司,英国); $\beta$ -actin(武汉塞维尔生物科技公司);CCK-8检测试剂盒、还原性谷胱甘肽(glutathione, GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)检测试剂盒、脂质氧化丙二醛(malonaldehyde, MDA)检测试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);FerroOrange(DOJINDO公司,日本);C11-BODIPY(Cayman公司,美国);RSL3、Erastin(Selleck公司,美国);

Lipofectin 3000(Invitrogen公司,美国);DMEM培养基和胎牛血清(HyClone公司,美国);嘌呤霉素(puromycin, MCE公司,美国);总RNA提取试剂盒(南京诺唯赞公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

黑色素瘤细胞株B16F10、B16F1均使用含有10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行后续实验。

#### 1.2.2 细胞转染

细胞铺板后,待细胞汇合度为70%~80%时,按照Lipofectin3000说明书进行质粒或siRNA片段转染,转染6~8 h后换成含10%胎牛血清的DMEM培养基继续培养24~48 h,然后收集细胞,采用总RNA提取试剂盒和RIPA裂解液分别提取细胞总RNA和总蛋白进行后续实验。

#### 1.2.3 ANXA5基因的敲除及敲减

在黑色素瘤细胞B16F10中采用CRISPR-Cas9技术敲除ANXA5基因,根据Mus musculus ANXA5(cDNA clone MGC:5730 IMAGE:3488901)设计gRNA 5'-caccgcacgactctacgatgctac-3',靶向ANXA CDS(coding sequence)序列在第256~275位置。将gRNA退火产物与LentiCRISPR v2酶切载体混合16℃酶连过夜,连接产物转化感受态细胞,涂板后挑取单克隆菌落进行基因测序。构建好的质粒转染B16F10细胞构建敲除株,采用筛选压力2  $\mu$ g/mL puromycin进行培养,最后采用梯度稀释接种96孔板筛选ANXA5-KO单克隆敲除细胞株。

采用RNAi技术敲低ANXA5,合成靶向human ANXA5的siRNAs序列为:5'-AACTACTCCTTGCT-GTTGTGA-3'(siANXA5#1)和5'-AAGCCTGGAAGAT-GACGTGGT-3'(siANXA5#2),通过脂质体lipo3000转染A375细胞株,Western blot验证siRNA敲减效果。

#### 1.2.4 CCK-8检测

将细胞浓度调整为 $1 \times 10^4$ 个/mL,每孔100  $\mu$ L接种96孔板,每组设置3个复孔,每孔再补100  $\mu$ L培养基,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养;质粒或siRNA转染24~48 h后每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液,设置培养液的空白孔作为对照组,37℃孵育2 h后在酶标仪上检测各组在450 nm吸光度值,记录每组不同复孔的数据进行统计分析。

#### 1.2.5 LDH、GSH和MDA含量检测

将细胞浓度调整为 $1 \times 10^5$ 个/mL,每孔500  $\mu$ L接种24孔板铺板。次日,根据实验设计分成对照组,不

同剂量给药组等,每组3个复孔。给药后不同时间点吸取各组培养孔中的细胞培养上清液,参照LDH试剂盒说明书与对应试剂混匀,室温放置5 min,酶标仪测定,记录各样品在450 nm处吸光度值进行统计分析。

收集细胞,超声破碎细胞后,离心获取细胞裂解上清液,采用TBA法进行MDA检测,在上清液中加入底物显色,在532 nm有最大吸收峰,利用532 nm与600 nm下的吸光度差值计算过氧化脂质MDA的含量。采用DTNB法检测GSH,参照GSH测定试剂盒说明书,加入各试剂,混匀静置5 min,在405 nm酶标仪测定各孔吸光度值,总谷胱甘肽(GSSG+GSH)量为黄色的TNB形成量。再采用GSH清除试剂处理样本测定GSSG的含量,GSH含量即为总谷胱甘肽(GSSG+GSH)的量扣除GSSG的含量。

#### 1.2.6 脂质过氧化的检测

C11-BODIPY 581/591是一种脂质过氧化的荧光探针,对氧自由基敏感。目标细胞经给药处理建立铁死亡细胞模型后,加入适当C11-BODIPY 581/591(终浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ ),孵育1 h。然后用PBS洗涤细胞2次,用胰酶消化制备细胞悬液进行流式细胞检测。采用FL1、FL2通道分别检测对应信号,C11-BODIPY 581/591在细胞膜内与活性氧发生氧化还原反应,与脂质活性氧的产生成正比,测定FL1荧光信号以可视化监测细胞脂质过氧化程度。

#### 1.2.7 亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )的检测

使用高细胞渗透性的荧光探针FerroOrange检测胞内 $\text{Fe}^{2+}$ 水平。将待测定细胞吸去培养基,用无血清DMEM清洗3次,然后加入适量浓度为1 mmol/L的FerroOrange工作液,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,再滴加DAPI进行复染2 min,取出细胞爬片置于载玻片上,进行荧光倒置显微镜观察、拍照。

#### 1.2.8 RT-qPCR

根据RNA提取试剂盒说明书提取各组细胞总RNA,逆转录成cDNA后进行qPCR,引物序列分别为: mouse *Ascl4* - F: 5' - CTCACCATTATATTGCTGCCTGT; *Ascl4* - R: 5' - TCTCTTTGCCATAGCGTTTTT; mouse  $\beta$ -actin-F: 5' - GGCTGTATTCCTCCATCG; mouse  $\beta$ -actin-R: 5' - CCAGTTGGTAACAATGCCATGT。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 方法进行数据分析,比较各组间基因表达情况。

#### 1.2.9 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡和水化后用PBS冲洗,采用10 mmol/L Tris, pH10.0, 95  $^{\circ}\text{C}$ 加热12 min缓慢冷却至室温进行抗原修复,然后滴加免疫染色封闭液,封闭

60 min, PBS冲洗,接着一抗孵育(anti-ANXA5)4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜;次日PBS冲洗充分后,滴加100  $\mu\text{L}$ 二抗溶液室温下孵育40 min,接着PBS冲洗3次,除去PBS后滴加50  $\mu\text{L}$ 新鲜配制的DAB溶液,显微镜下观察3~5 min,显色后经梯度酒精脱水干燥,中性树胶封固拍照。

#### 1.2.10 Western blot

提取细胞的总蛋白,用10% SDS-PAGE胶进行蛋白分离,并转移到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,加入相应一抗溶液4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日使用PBST洗涤膜3次,室温孵育二抗1 h, PBST清洗膜3次,最后对膜进行曝光成像, Image J软件定量分析。

#### 1.3 统计学方法

运用Graphpad Prism 8统计软件对数据进行统计分析,不同组间的差异比较使用Student's *t*检验或单因素方差分析,两组以上的多组间比较采用ANOVA单因素方差分析。每组实验均重复3次,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

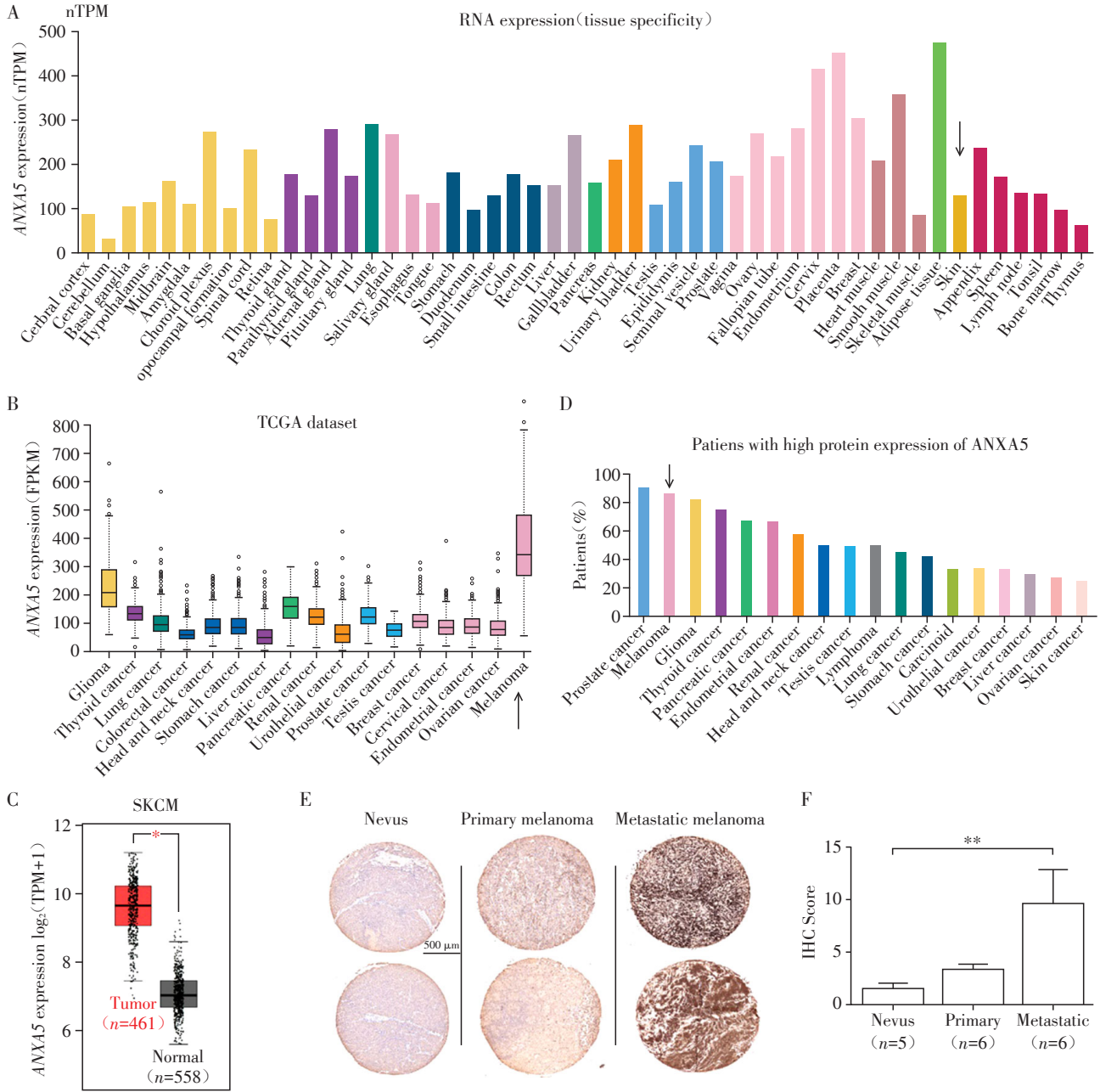
## 2 结果

### 2.1 ANXA5在黑色素瘤组织中表达水平升高

根据The Human Protein Atlas (HPA)数据库(<https://www.proteinatlas.org>)分析显示,在人体正常组织中,ANXA5 mRNA在皮肤组织中表达水平较低(图1A);TCGA数据库分析显示,在人体各癌变组织中,ANXA5 mRNA在黑色素瘤中显著高表达(图1B)。进一步通过GEPIA2对比皮肤黑色素瘤(skin cutaneous melanoma, SKCM)与正常皮肤组织的转录数据,发现ANXA5 mRNA在SKCM中的表达水平较癌旁正常组织显著升高(图1C,  $P < 0.05$ )。此外,来自Protein Atlas蛋白水平的数据显示,在各肿瘤患者中,约90%患者黑色素瘤组织检测到ANXA5蛋白的高表达(图1D)。免疫组化染色分析人黑色素瘤组织芯片(MEL961)中ANXA5蛋白的表达水平,结果显示与痣相比,原发性黑色素瘤中ANXA5蛋白染色程度加深,且在转移性黑色素瘤中显著升高(图1E、F,  $P < 0.01$ ),提示ANXA5表达可能与黑色素瘤发生发展呈正相关。

### 2.2 敲除ANXA5增强黑色素瘤对铁死亡的易感性

为探究ANXA5高表达是否影响黑色素瘤对铁死亡的敏感性,以黑色素瘤细胞株B16F10为研究对象,借助CRISPR-CAS9技术构建ANXA5敲除细胞株(ANXA5-KO)(图2A),在此基础上采用铁死亡诱导剂RSL3或Erastin建立黑色素瘤细胞铁死亡模型。与野生型(wild type, WT)B16F10细胞相比,随着铁死



A: ANXA5 RNA expression in human tissues from the HPA database. B: ANXA5 mRNA expression in tumors from the TCGA database. C: The analysis of ANXA5 mRNA expression in SKCM tumor tissues and adjacent normal tissues from GEPIA2 database. D: High protein levels of ANXA5 in patients with tumor from the HPA database. E, F: Immunohistochemistry staining of human melanoma tissues, including nevus, primary melanoma, and metastatic melanoma (scale bars=500 μm). \*\**P* < 0.01.

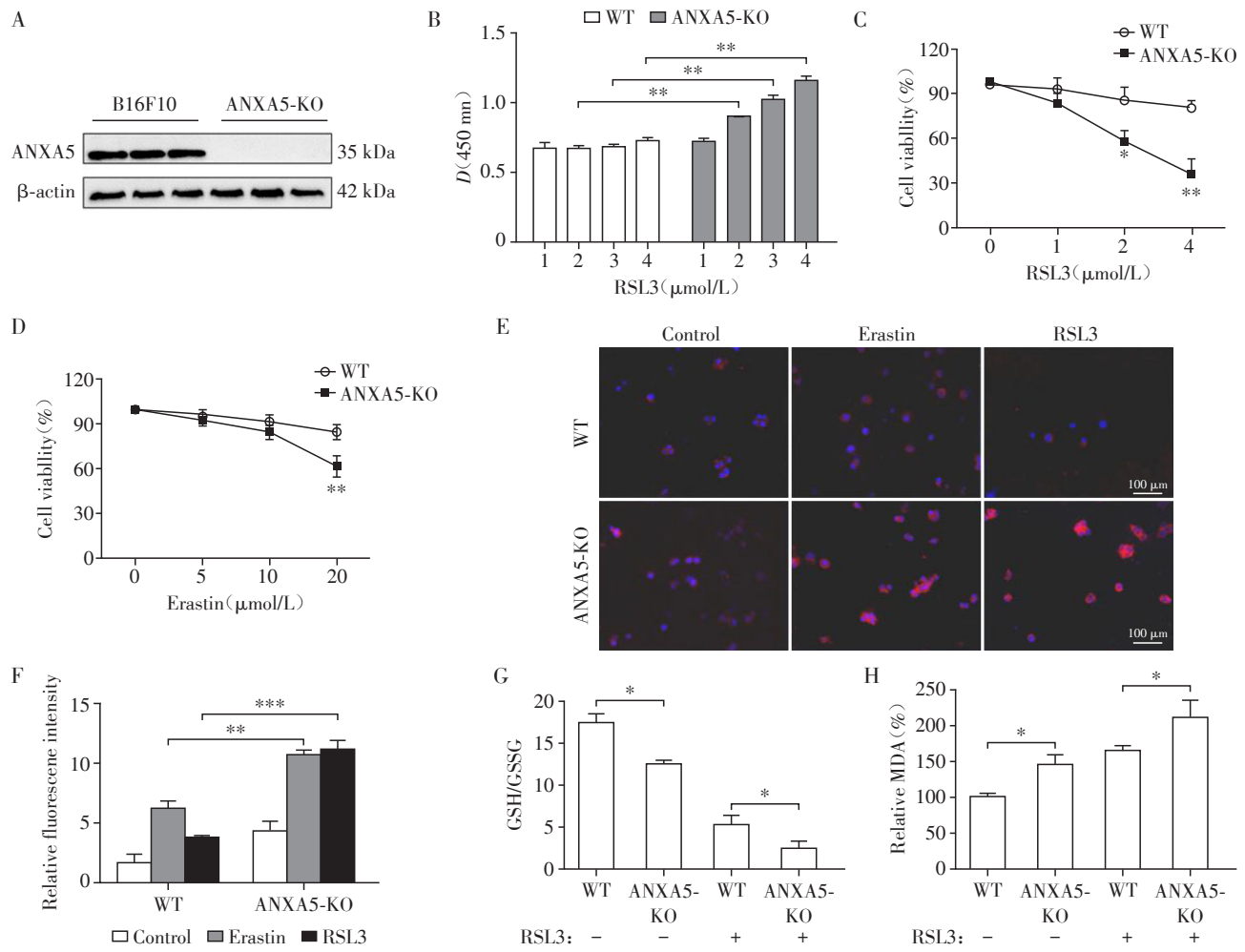
图1 ANXA5在黑色素瘤中高表达并与黑色素瘤发展正相关

Figure 1 ANXA5 was highly expressed in melanoma and positively correlated with melanoma development

亡诱导剂RSL3的剂量增加, ANXA5-KO组细胞上清液LDH水平显著增加(图2B, *P* < 0.05), 提示细胞膜破损程度加重; CCK-8检测显示细胞活力明显下降(图2C, *P* < 0.05), 可见ANXA5-KO细胞表现出对铁死亡诱导剂RSL3的易感性, 细胞死亡效应增强。采用另一种铁死亡诱导剂Erastin处理, 类似地, ANXA5-KO细胞表现出更低的细胞活力(图2D, *P* < 0.05)。

铁死亡是铁离子依赖性的细胞死亡形式, 铁蓄积是铁死亡的标志之一。当借助FerroOrange(Fe<sup>2+</sup>荧光探针)进行荧光成像观察时, 相比WT细胞, 在RSL3或Erastin诱导下ANXA5-KO细胞中铁离子蓄积更为明显(图2E、F, *P* < 0.01)。而亚铁离子增加会通过芬顿反应产生大量羟自由基, 引起细胞内抗氧化系统失衡, 于是进一步对细胞内氧化还原状态进行检测, 结果

显示:ANXA5-KO细胞呈更明显的氧化应激状态,即GSH/GSSG比例下降(图2G,  $P < 0.05$ ),MDA含量显著升高(图2H,  $P < 0.05$ )。这些结果表明敲除ANXA5能增强黑色素瘤细胞对铁死亡的易感性。



A: ANXA5 knockout validated in B16F10 cells by Western blot. B: Assays for LDH release induced by RSL3. C: CCK-8 assays for B16F10 cells treated by RSL3. D: CCK-8 assays for B16F10 cells treated by Erastin. E, F: Fluorescence detection of  $Fe^{2+}$  by FerroOrange staining in red (scale bar = 100  $\mu m$ ). G: The changes of GSH/GSSG ratio induced by RSL3 treatment. H: Intracellular lipid peroxidation detected by MDA assays. Compared with the WT group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

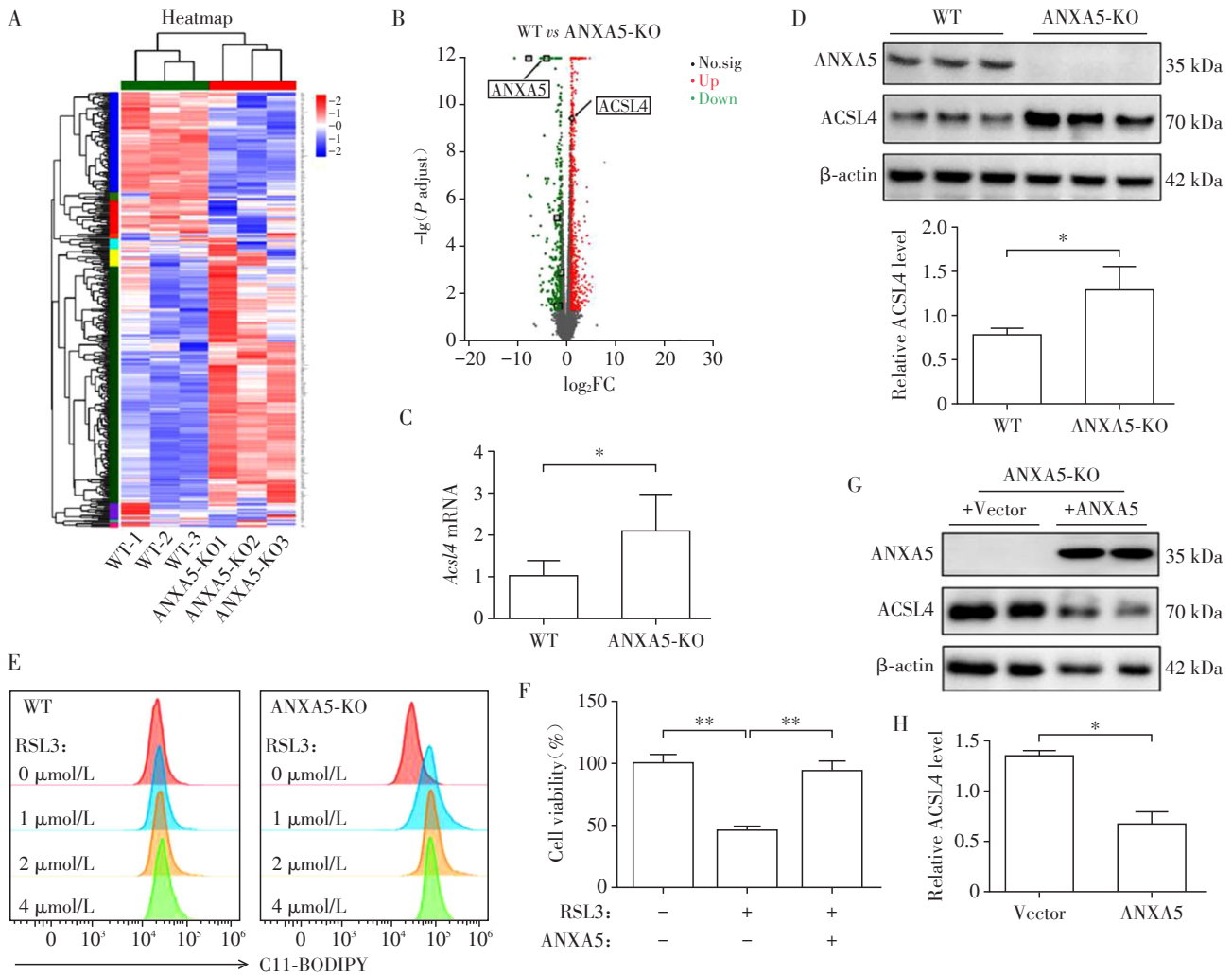
图2 敲除ANXA5增强RSL3或Erastin诱导黑色素瘤细胞铁死亡效应

Figure 2 Knockout of ANXA5 promoted susceptibility of ferroptosis induced by RSL3 or Erastin in melanoma cells

### 2.3 ANXA5负调节铁死亡蛋白ACSL4的表达

为探究ANXA5参与黑色素瘤细胞铁死亡防御的可能机制,对WT和ANXA5-KO细胞进行了RNA-seq分析,结果表明敲除ANXA5能显著影响黑色素瘤细胞的基因表达谱(图3A)。ACSL4是调节脂质组成的关键酶,能促进铁死亡的发生,决定了细胞对铁死亡的敏感性<sup>[9]</sup>。通过火山图显示差异性表达基因,相比WT组,ANXA5-KO细胞中*Acs14* mRNA上调2.278倍(图3B)。通过RT-qPCR和Western blot进一步验证,敲除ANXA5后,*Acs14* mRNA和ACSL4蛋白水平均显著上升(图3C、D)。铁死亡过程中,细

胞膜上饱和脂肪酸发生脂质过氧化是有别于其他程序性死亡的生化特征,采用C11-BODIPY染色进行流式检测,ANXA5-KO细胞膜脂质过氧化程度显著增加(图3E)。当ANXA5-KO细胞中回补ANXA5表达时,ANXA5能明显抑制黑色素瘤细胞的铁死亡效应,表现出对铁死亡诱导剂的抵抗性(图3F),此时ACSL4蛋白水平随着ANXA5表达增加而显著下降,Western结果显示ANXA5能负调节ACSL4蛋白水平(图3G、H)。由此可见,ANXA5调控ACSL4表达可能是其参与黑色素瘤细胞铁死亡调节的作用机制之一。



A: Heatmap of WT and ANXA5-KO samples. B: Analysis of differentially expressed genes by the volcano plot. C: RT-qPCR for *Acsl4* mRNA. D: Western blot analysis for ACSL4 and ANXA5 protein levels. E: FACS analysis for lipid-ROS stained by C11-BODIPY. F: ANXA5 expression rescued the resistance to RSL3-induced ferroptosis. G, H: The negative regulation of ACSL4 by ANXA5 detected by Western blot. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ ).

图3 ANXA5负调控ACSL4水平参与黑色素瘤细胞铁死亡敏感性的调节

Figure 3 ANXA5 negatively regulated ACSL4 levels involved in the sensitivity regulation of ferroptosis

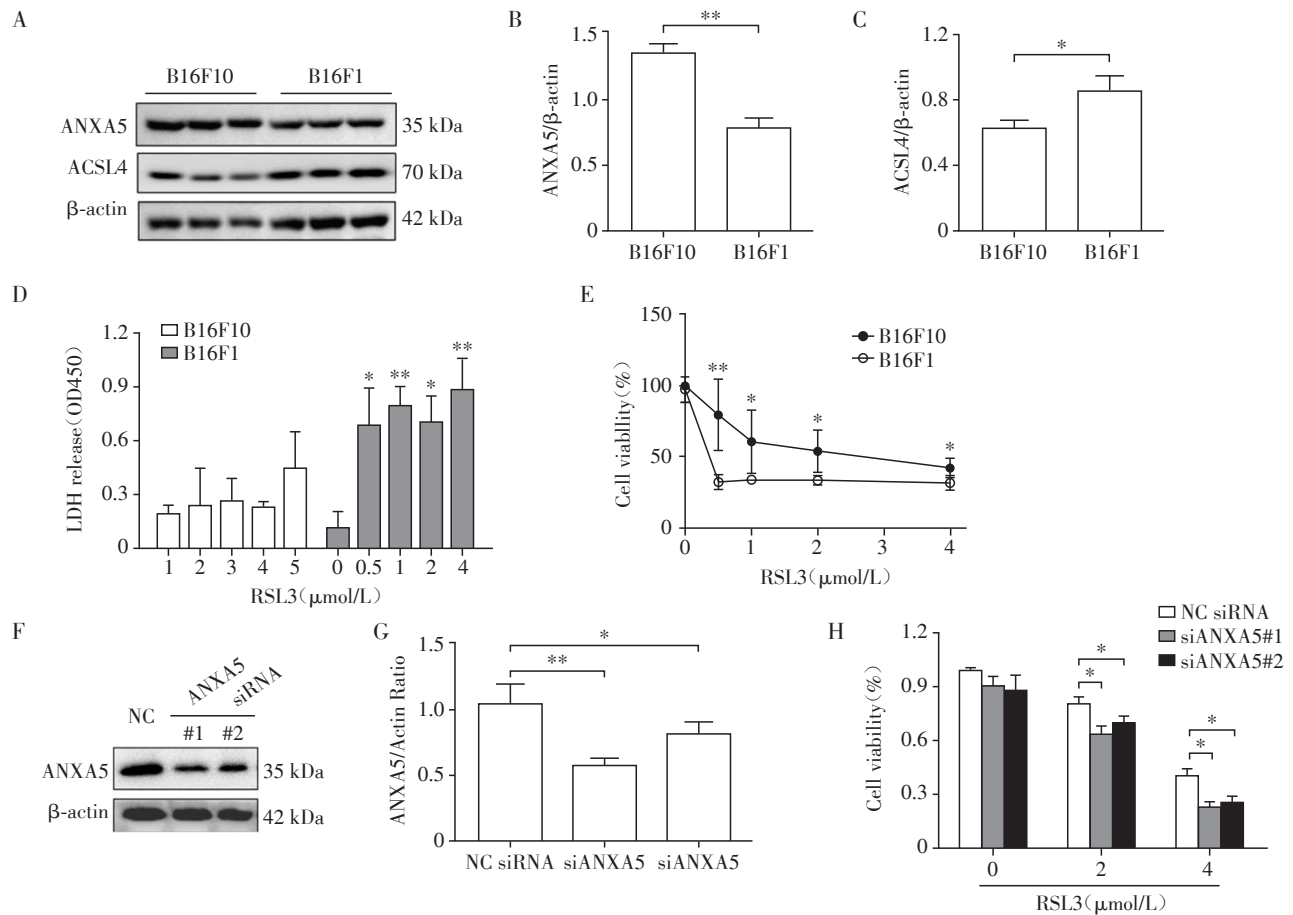
#### 2.4 ANXA5是靶向铁死亡治疗黑色素瘤的潜在靶点

为了进一步验证ANXA5对黑色素瘤细胞铁死亡敏感性的调控作用,以小鼠黑色素瘤B16F1与B16F10为研究对象进行比较。通过Western blot分析,相比B16F10,B16F1中ANXA5表达水平较低,而ACSL4水平较高,与上述ANXA5负调节ACSL4的结果一致(图4A~C)。接着在RSL3诱导铁死亡发生过程中,B16F1细胞膜破损,LDH释放量增加(图4D),并且在低剂量0.5  $\mu\text{mol/L}$  RSL3诱导下其细胞存活率已大幅度降低(图4E),表明B16F1比B16F10具有更强的铁死亡易感性,与ANXA5表达水平负相关。进一步在人黑色素瘤细胞A375中采用RNAi敲减ANXA5进行验证,结果显示:ANXA5 siRNA能有效敲低内源性ANXA5水平(图4F、G),从而增强了

黑色素瘤细胞A375对RSL3诱导铁死亡的易感性(图4H)。这些结果表明ANXA5可能成为铁死亡治疗黑色素瘤的潜在靶点。

### 3 讨论

肿瘤细胞对凋亡的内在性、获得性抵抗使得抗癌药物的治疗效果受限,耐药性是肿瘤治疗的主要限制因素,而利用其他形式的非凋亡性细胞死亡则为抗肿瘤提供了新的治疗策略。铁死亡是近些年发现的一种新的细胞程序性死亡模式,是铁依赖性的并以细胞内活性氧堆积为特征的非凋亡形式的细胞死亡。铁成癸性、脂质代谢异常及其活性氧累积在恶性肿瘤细胞与正常细胞之间存在差异,这些差异也是铁死亡的关键调控因素,使得肿瘤细胞对



A-C: Western blot analysis for ANXA5 protein levels. D: The LDH release induced by RSL3 in B16F1 and B16F10 cells. E: CCK-8 assays for B16F1 and B16F10 treated with RSL3. F, G: Validation of ANXA5 knockdown in A375 cells by Western blot. H: CCK-8 assay for A375 cells transfected with siRNA5. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ ).

图4 黑色素瘤细胞中ANXA5水平与铁死亡敏感性呈负相关

Figure 4 ANXA5 levels in melanoma cells was negatively correlated with ferroptosis sensitivity

铁死亡更敏感<sup>[10]</sup>。不同肿瘤细胞系对铁死亡的敏感性和作用机制均不同,本研究发现ANXA5在黑色素瘤细胞中高表达,通过细胞铁死亡模型说明ANXA5增强黑色素瘤细胞对铁死亡的抵抗性。有报道研究ANXA5治疗神经性疾病的疗效可能与缓解神经细胞的铁死亡相关<sup>[11]</sup>,但在肿瘤研究中,尚未见ANXA5调节肿瘤细胞铁死亡的相关报道。本研究发现ANXA5调节黑色素瘤细胞铁死亡的敏感性和耐受性,这对探究ANXA5调节黑色素瘤细胞铁死亡的作用机制具有重要临床指导意义。

铁死亡的发生需过氧化多不饱和脂肪的理论已被广泛接受,磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)是铁死亡过程中氧化的主要底物,而促铁死亡基因ACSL4作用调节脂质组成的关键酶,参与形成富含长链不饱和脂肪酸的膜脂(如PE)<sup>[12]</sup>。抑制ACSL4表达能促使细胞对铁死亡脱敏,本研究中敲除ANXA5能显著上调ACSL4表达,增强黑色素瘤

细胞对铁死亡的敏感性。研究表明,转录共激活因子YAP介导TFR和ACSL4基因的转录,减弱YAP能抑制铁死亡<sup>[13]</sup>。此外YAP能与ANXA2相互作用结合到细胞膜上,抑制ANXA2则促进YAP从膜上释放出来,成为具有转录活性的YAP入核上调ACSL4 mRNA水平,表现出铁死亡易感性<sup>[14]</sup>。ANXA5与ANXA2作为膜联蛋白家族成员,在结构功能上有着众多相似,提示了ANXA5也有可能负调节YAP的激活,从而负调控ACSL4表达。此外,Kan等<sup>[15]</sup>报道了PPAR $\delta$ 介导ACSL4表达的调控机制,而ANXA1能调节PPAR $\delta$ 信号通路激活<sup>[16]</sup>。这些报道为探究ANXA5调节ACSL4表达的分子机制提供了思路 and 依据,具体作用机制还有待进一步研究。

目前,分子靶向癌症治疗仍面临耐药性和少数受益患者的挑战,靶向治疗增敏的探索备受关注。维莫非尼(Vemurafenib)是一种用于治疗恶性黑色素瘤的药物,Tsoi等<sup>[17]</sup>研究发现铁死亡诱导剂Eras-

tin大大增强了Vemurafenib对黑色素瘤细胞M229R和M238R的杀伤能力。Sorafenib是多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂,也可作为铁死亡诱导剂应用到肝癌靶向治疗中<sup>[18-19]</sup>。本研究发现敲除或敲减ANXA5能促进铁累积和脂质过氧化的病理改变,明显增强铁死亡诱导剂RSL3或Erastin对黑色素瘤细胞的杀伤效应,提示了ANXA5可能成为促进肿瘤靶向增敏的新的潜在靶点,能协同诱导铁死亡介导的肿瘤细胞死亡与化疗药物、分子靶向药等联用,可能为黑色素瘤治疗提供新的临床视野。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

#### Conflict of Interests:

The authors declare no competing interests.

#### 作者贡献声明:

王嘉慧和李璐琪完成生信分析、及大部分实验;张悦完成Western blot和qPCR验证;张肖文参与补充数据和论文修改,张晶设计总体实验,分析数据,并撰写了论文。

#### Author's Contributions:

WANG Jiahui and LI Luqi performed the majority of experiments and completed bioinformatics analysis. ZHANG Yue completed Western blot and qPCR experiments. ZHANG Xiaowen participated in the supplementary data and helped the manuscript writing. ZHANG Jing designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.

#### [参考文献]

- [1] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072
- [2] ZHANG C, LIU X Y, JIN S D, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 47
- [3] GAGLIARDI M, SAVERIO V, MONZANI R, et al. Ferroptosis: a new unexpected chance to treat metastatic melanoma?[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(19): 2411-2425
- [4] SCHUTTERS K, REUTELINGSPERGER C. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(9): 1072-1082
- [5] ZHANG X R, SONG L L, LI L, et al. Phosphatidylserine externalized on the colonic capillaries as a novel pharmacological target for IBD therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 235
- [6] VANGESTEL C, PEETERS M, OLTENFREITER R, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of [<sup>99m</sup>Tc]-labeled tricarbonyl His-annexin A5 as an imaging agent for the detection of phosphatidylserine-expressing cells[J]. *Nucl Med Biol*, 2010, 37(8): 965-975
- [7] KANG T H, PARK J H, YANG A, et al. Annexin A5 as an immune checkpoint inhibitor and tumor-homing molecule for cancer treatment[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1137
- [8] WOODWARD A, FARIAG N F, HARRISON R G. Annexin A5 as a targeting agent for cancer treatment[J]. *Cancer Lett*, 2022, 547: 215857
- [9] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98
- [10] HASSANNIA B, VANDENABEELE P, VANDEN BERGHE T. Targeting ferroptosis to iron out cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6): 830-849
- [11] GAO Y L, ZHANG H J, WANG J W, et al. Annexin A5 ameliorates traumatic brain injury-induced neuroinflammation and neuronal ferroptosis by modulating the NF- $\kappa$ B/HMGB1 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 114: 109619
- [12] YUAN H, LI X M, ZHANG X Y, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1338-1343
- [13] WU J, MINIKES A M, GAO M H, et al. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling[J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 402-406
- [14] SHALHOUT S Z, YANG P Y, GRZELAK E M, et al. YAP-dependent proliferation by a small molecule targeting annexin A2[J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(7): 767-775
- [15] KAN C F K, SINGH A B, DONG B, et al. PPAR $\delta$  activation induces hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 4 expression *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(5): 577-587
- [16] WU L, LIU C J, CHANG D Y, et al. The attenuation of diabetic nephropathy by annexin A1 viaregulation of lipid metabolism through the AMPK/PPAR $\alpha$ /CPT1b pathway[J]. *Diabetes*, 2021, 70(10): 2192-2203
- [17] TSOI J, ROBERT L, PARAISO K, et al. Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(5): 890-904
- [18] XU F L, WU X H, CHEN C, et al. SLC27A5 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by downregulating glutathione reductase [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 22
- [19] LI Z J, DAI H Q, HUANG X W, et al. Artesunate synergizes with sorafenib to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2): 301-310

[收稿日期] 2024-08-23

(本文编辑:戴王娟)