

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱 : 亞錳離子誘發A498、HepG2 cells產生Ferroptosis之評估研究

報 告 類 別 : 成果報告
執行計畫學生 : 胡瑞凌
學生計畫編號 : MOST 110-2813-C-040-093-E
研究期間 : 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月
指導教授 : 李明偉

處理方式 : 本計畫可公開查詢

執行單位 : 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中華民國 111年04月06日

計畫名稱: 亞錳離子誘發 A498、HepG2 cells 產生 Ferroptosis 之評估研究

研究計畫內容：

一、摘要

先前已有研究指出錳能誘導 caspase 3 導致細胞凋亡，其作用包含增加胞內的氧化壓力、加劇 ER stress、或降低膜電位等，最終藉由增加 ROS 讓 mtDNA 或 ETC 受損或引導讓粒線體膜通透率增加而使細胞走向死亡。亦有研究發現錳的複合物能使癌細胞走向 Ferroptosis。Ferroptosis 被定義為非細胞凋亡的早期細胞死亡方式。Ferroptosis 的兩個特徵是 ROS 的過度累積和脂質過度過氧化，這現象有別於 Apoptosis、necrosis、autophagy 的死亡方法。本實驗預計使用亞錳離子探討 A498(腎臟癌)和 HepG2(肝癌) cells 是否有能力誘導 Ferroptosis，做為未來癌症新療法的策略參考。實驗將採用亞錳離子與腎臟癌和肝癌細胞共同培養，透過流式細胞儀，監測亞錳離子是否讓細胞產生凋亡。並以蛋白質電泳，探討細胞凋亡的途徑，判別哪種胞器收損而導致的細胞死亡，再檢測氧化壓力、西方墨點分析，評估亞錳離子有無誘發 Ferroptosis 的訊息傳遞路徑，預計所追蹤的生化反應為 GPX4、Lipid peroxide。本研究也將探討錳離子和亞錳離子對誘發癌細胞產生 Ferroptosis 能力之差異。

二、研究動機與研究問題

探討錳離子的生理機制時，發現亞錳離子能誘導前列腺癌細胞凋亡進而抑制癌細胞的活性[1]，若當作化療的奈米藥物，藉著 Apoptosis 或是 Ferroptosis 讓癌細胞死亡，再憑藉奈米大小適當地控制其保留程度和滲透作用在癌細胞上，並延長奈米藥物在血液循環的時間，藉此提 EPR(enhanced permeability and retention effect)。論文僅止於研究前列腺癌，因此將針對國人排名第二的肝癌和逐年增加發生率的腎癌進行研究，深入探討亞錳離子作用方式，例如讓癌細胞走向細胞凋亡的途徑，亞錳離子是否能比市面上化療藥物更有效地使腫瘤變小，檢測不同的癌症所適合的亞錳離子濃度，即是測出各癌症的 IC50，再根據流式細胞儀和蛋白電泳得出的數據，猜測亞錳離子走的細胞死亡路徑，而 Apoptosis 和 Ferroptosis 對於細胞是兩種不同的死亡方式，研究卻尚未對兩者有無相關性做解釋，又或者兩者是否有前因後果的關係，因為 ROS 的發生皆是兩者的原因，後續的實驗將針對亞錳離子引發的 Apoptosis 和 Ferroptosis 做評估，兩種情況何者能更快速使 A498、HepG2 cells 死亡。

三、 文獻回顧與探討

1. 亞錳離子引發細胞死亡的潛能

2020年Kazuya Yagyū等人研究指出，利用MnCl₂可誘導PC12 cells細胞凋亡，主要透過活化上游的JNK，使蛋白水解活化Protein kinase R、cleaved caspase-3和促使DNA fragmentation發生，亞錳離子增加氧化壓力使PP2A和PP5被抑制，導致ERK1/2和p38MAPK pathways活化[2]。2011年，Yu Deng等人讓Astrocytes暴露於500 μM MnCl₂，發現細胞存活率不到50%，再和控制組相比，LDH增加94.54%，G₀/G₁ phase上升的現象和控制組相比升高了11.08%，最後Astrocytes暴露於500 μM MnCl₂，細胞凋亡率跟控制組比起來多了29.19% [3]。近年來，研究人員開始製作錳離子的複合物，在2014年時，Jia liu等人合成AdpaMn {[(Adpa)Mn(Cl)(H₂O)] (Adpa=bis(2-pyridylmethyl)amino-2-propionic acid)}，研究顯示，它能抑制細胞生長(IC₅₀低於15μM)，Adpa-Mn可透過Transferrin-transferrin receptor system找到腫瘤細胞，並誘使chromatin condensation，讓癌細胞走向凋亡或是細胞自噬，利用蛋白質電泳檢測兩種不同的Adpa-Mn，可見濃度10mg/kg的Adpa-Mn能清晰出現代表細胞凋亡和自噬的蛋白PARP、cleaved caspase 3、LC3(圖1)，癌細胞被Annexin V/PI染色後，為研究細胞凋亡和ROS的關聯，研究人員將另一個對照組加入NAC (ROS的抑制劑)，比較皆有添加Adpa-Mn 20μM差別在於NAC的有無，只有加入Adpa-Mn的組別，細胞凋亡率較高(圖2)。

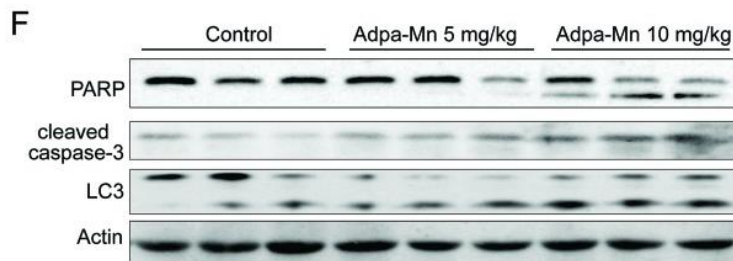


圖1 來自老鼠腫瘤組織的蛋白質，利用蛋白電泳分析

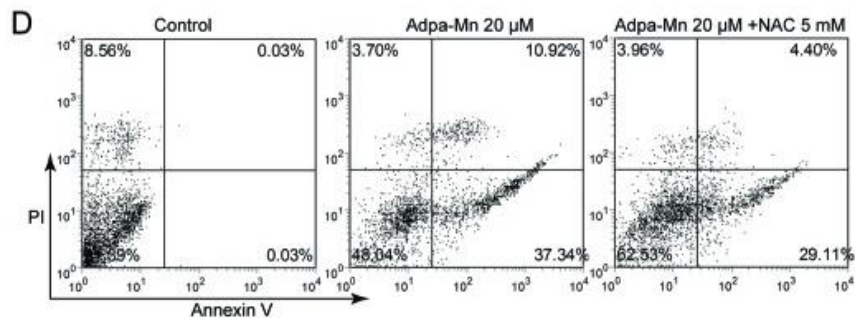


圖2 流式細胞儀偵測癌細胞細胞凋亡率

2020年Qingbo Xu等人合成MnMOF，讓H22 cells暴露MnMOF，經過實驗發現能催化H₂O₂生成O₂，並緩解低氧的腫瘤環境，MnMOF的加入降低了細胞內的GSH生成量(圖3)，MnMOF抑制細胞內的GPX4活性(圖4)，MnMOF讓脂質氧化的發生率提高(圖5)，促使研究人員發現MnMOF能使ROS和Ferroptosis發生，並藉此殺死癌細胞，此外實驗加進輻射治療可活化CD8⁺ T cells，增加dendritic cells，減少myloid-derived suppressor cells，可見MnMOF的潛力[5]。

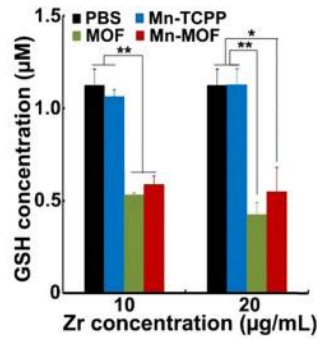


圖 3 MnMOF 和其餘對照組的 H22 cells 的 GSH 生成量比較

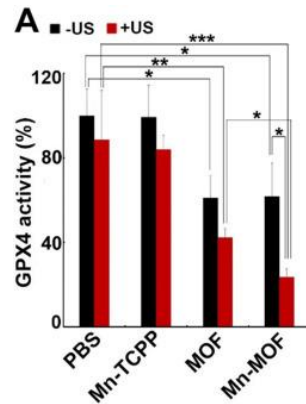


圖 4 MnMOF 和其餘對照組的 H22 cells 的 GPX4 活性比較

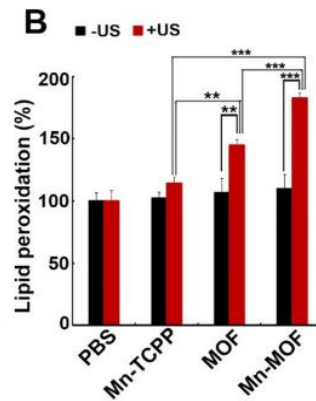


圖5 MnMOF和其餘對照組的H22 cells的脂質過氧化發生率比較

2. ROS 的介紹、ROS 的病理機制

Reactive oxygen species (ROS)是生物有氧代謝過程中的一種副產品，內含不穩定的 H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 等，上述皆是第二傳訊者，在正常細胞或是癌細胞是必要的存在，正常細胞中，ROS 可調節訊息傳遞與體內平衡，而過多的 ROS 則主要透過自由基氧化系統，如:Mn-SOD、cata-lase、glutathione peroxidase 等酵素清除自由基，一旦兩者的生成產生失衡，便會造成 oxidative stress(氧化壓力)，讓細胞內訊息傳遞混亂、細胞膜脂質過氧化，甚至能促使癌症的形成，但近期有許多論文證實 ROS 是個雙面刃，既能促使癌症形成，也能消除癌細胞。ROS 運用在化療的例子和原理透過 ROS 導致的細胞死亡最主要為活化 Programmed cell death，在外在途徑(extrinsic pathway)，ROS 被證實可以泛素化 c-FLIP(抗凋亡蛋白)，並增強了外在途徑[6]，在內在途徑中，會牽扯到 mitochondrail PTPs，ROS 增加其通透率，釋放出 cytochrome c(細胞色素 c)，在和 Apaf-1 結合，之後再和 Pro-caspase-9 形成 Apoptosome[7]，另外，ROS 會抑制 Bcl-2(anti-apoptotic protein)[8] (圖 6)，近期，有些藥品能誘導氧化壓力並加劇 ER stress(內質網壓力)，進而發生細胞凋亡，例如:Bortezomib 和 Celecoxib。

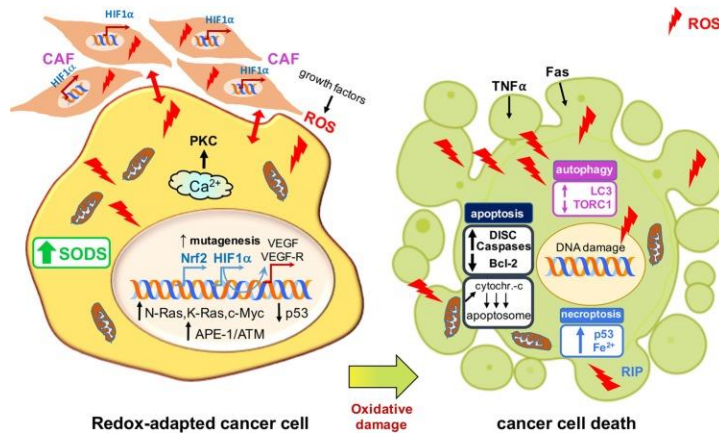


圖 6 癌細胞被升高的 ROS 誘導細胞程序性死亡

表 1 以下是誘導 ROS 發生的抗癌藥物機制[9]

Name	Mechanism of action
<i>Direct ROS generation</i>	
Motexafin gadolinium	Accepts electron to form superoxide
Doxorubicin	Induces chelation of iron to generate hydroxyl radical
Cisplatin	Damage mtDNA(mitochondrail DNA) and ETC
2-Methoxyestradiol	Inhibits ETC complex I

3. Ferroptosis 的介紹，Ferroptosis 的病理機制

Ferroptosis 是鐵依賴的脂質過氧化累積的細胞死亡，在形態學上，粒線體會受到擠壓、粒線體膜的密度增高、膜的完整性缺失、NADH 在細胞質中減少，讓 Ferroptosis 產生和下列這些現象有關，lipid synthesis、iron metabolism 和 GPX4 (system Xc-) 等其他影響因子(圖 7)。Lipid synthesis 的 ACSL4 在 Ferroptosis 是具有代表性的 biomarker，ACSL4 會促使 PUFA 轉變成 lipid peroxides [15]，引發 Ferroptosis。Iron metabolism 中，當二價鐵過多會導致 labile iron pool 的增加並讓 transferrin 和 transferrin receptor 失活，而 Fenton reaction 的發生使自由基產生，促使 PUFA 過氧化。GPX4 (system Xc-) 是 lipid repair enzyme，使過氧化的脂質轉成非毒性的脂質，一旦系統失活會導致 lipid peroxidation，而後 Lipid ROS 則會累積，GPX4 活性降低，最後導致細胞走向 Ferroptosis [10][11]。Ferroptosis 運用在化療的例子系統 Xc⁻ 是 cystine/glutamate antiporter system，其進行細胞外的 cystine 和細胞內的 glutamate 1:1 的交換，進入到胞內的 cystine 合成 GSH，之後再作為配體和 GPX4 結合，即可發揮清除 ROS 的作用，但是抑制系統 Xc⁻ 時(如 p53)，則會導致 ROS 增加，並發生 Ferroptosis，而 Erastin 和 Sorafenib 可以抑制此系統[10]，目前這兩種藥品在腎癌和肝癌的體外測試皆有成功[10]，則 RSL3 可以抑制 GPX4 的活性[13]。

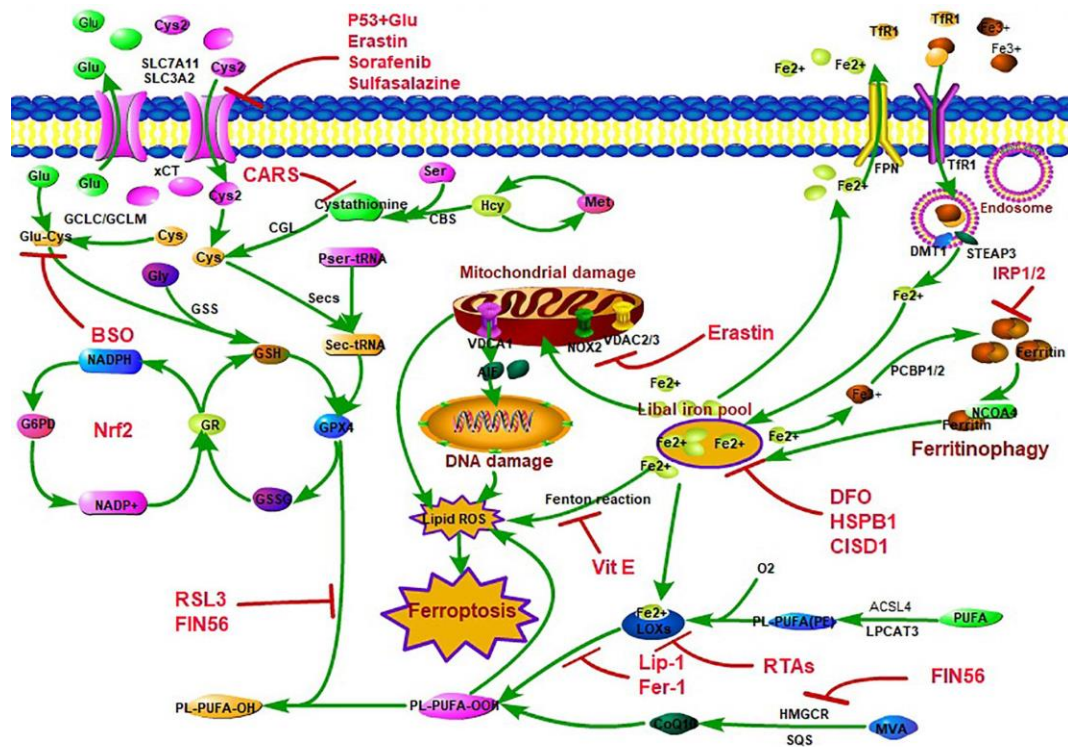


圖 7 引發 Ferroptosis 的分子路徑

4. 亞錳離子使細胞凋亡的途徑

在不同的胞器裡，錳的增加皆會帶來不同的效應。在粒線體中，錳的增加導致氧化劑的產生並釋放 cytochrome c、transcriptional disruption(轉錄中斷)，釋放出的 cytochrome 活化 caspase 8 和 caspase 9，再活化 caspase 3 進而導致細胞凋亡。錳的增加也會降低膜電位，ATP 隨之增加使 mitochondrial fission(粒線體裂變)和降低 mitochondrial fusion(粒線體融合)。在細胞膜中增加的錳，會讓 PKC δ 活化，也讓 caspase 8 活化，再導致細胞凋亡。細胞核中，增加的錳使 chromatin condensation(染色體凝聚)、DNA fragmentation(DNA 片段化)，也增加了 caspase 3。最後，錳的增加會加劇 ER stress，並增加未摺疊的蛋白，例如: Bip、PERK、Bima、Bax，這些蛋白使 caspase 12 活化，也會影響 caspase 3 讓細胞凋亡[12] (圖 8)。舉例:加入 0.25 mM 1mM MnCl₂ 至 PC-12 cells 18 小時，可見 caspase 3 增加，而加入 0.1 mM MnCl₂ 並培養 24 小時，會誘導 c-Jun N-terminal kinase signaling。加入 0.4 mM MnCl₂ 至 human B cells 培養 24 小時，誘導出 caspase 8 和 p38 MAPK[12]。

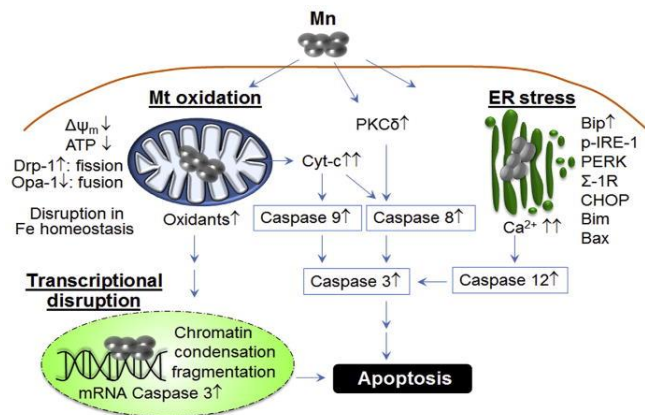


圖 8 錳誘導細胞凋亡的機制

四、研究方法與步驟

1. 製備 $MnCl_2$ 溶液

將0.0098 g的 $MnCl_2$ 加入10 ml的MEM (含有10% FBS和二合一抗生素)，配置出的濃度為 5000 μM ，pH值大約維持在7.4，加藥時再利用MEM稀釋至想要的濃度。

2. 用CCK-8測定細胞存活率

使用 96 well 測試，第一天，A498 cell每格種 3000 顆，HepG2 cell每格種 8000顆，第二天加入100 μl 的特定濃度的 $MnCl_2$ 溶液，進行四重複，測試 12hr、24hr、48hr的Cell viability，測試時每格加入10 μl 的CCK-8 reagent，經過兩個小時後，使用全功能螢冷光判讀儀以450 nm測定吸收波長，再進一步地算出IC50。

A498 cell對於 $MnCl_2$ 溶液的IC50是 17.08 μM (24hr)，後續將以 **10 μM** 、**15 μM** 、**20 μM** 為實驗組濃度。

HepG2 cell對於 $MnCl_2$ 溶液在第二天IC50是 37.5 μM ，後續將以 **30 μM** 、**37.5 μM** 、**45 μM** 為實驗組濃度。

公式：

$$[(\text{Sample吸收波長}-\text{Blank吸收波長})/(\text{Control吸收波長}-\text{Blank吸收波長})] \times 100\%$$

3. 測定 Apoptosis (以A498 cells為例)

第一天種 A498 cell 於6孔盤上，每格種 10^5 顆，第二天加入2 ml的 10 μM 、15 μM 、20 μM 的 $MnCl_2$ 溶液，第三天拿取Control、10 μM 、15 μM 、20 μM 、FITC組、PI組、Control negative的細胞，將其從培養皿收取至15cc的離心管中，離心3000 rpm 5分鐘，倒掉上清液，各用100 μl 稀釋過的binding buffer (binding buffer : ddH₂O = 1:9) 回溶，Control、10 μM 、15 μM 、20 μM 再各加入5 μl 的 FITC 和 PI，而FITC組加入 5 μl 的FITC，PI組 加入 5 μl 的PI，Control negative不須加入任何FITC和PI，回溶後全部避光10分鐘後，加入400 μl 稀釋的binding buffer至全部的ependorf，進入管內過篩後，使用流式細胞儀偵測是否發生細胞凋亡。

4. **測定 ROS** (以A498 cells為例)

第一天種 A498 cell 於6孔盤上，每格種 10^5 顆，第二天加入2 ml 的 $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 的 MnCl_2 溶液，第三天拿取Control、 $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、Positive control、Negative control、Control negative的細胞，將其從培養皿收取至15cc的離心管中，離心3000 rpm 5分鐘，倒掉上清液，除了Control negative只需加入一般的500 μl wash buffer，其他皆加入 500 μl 的 wash buffer (10ml wash buffer + 2 μl oxidative stress detection)，Positive control再加入 20 μl 的ROS inducer，Negative control再加入 5 μl 的ROS inhibitor，避光放入incubator 30分鐘之後，利用流式細胞儀偵測 ROS的變化量。

5. **測定 Lipid peroxidation** (以A498 cells為例)

第一天使用6 cm Dish，每盤種 10^6 顆，第二天加入 3 ml 的 $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 的 MnCl_2 溶液，第三天取出Control、 $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ ，將其從培養皿收取至15cc的離心管中，離心1500 rpm 5min，倒掉上清液，各加入 300 μl MDA Lysis Buffer + 3 μl BHT，之後將溶液移至eppendorf，離心 13000 g, 10 min, 4°C 後，放在冰桶裡避光，在各加入 0、2、4、6、8 μl 2mM MDA Standard Solution至 200 μl ddH₂O，再取 200 μl 的Control、 $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 至 eppendorf，全部再加上 600 μl TBA Reagent，再加熱 95°C , 60 min，最後移入冰桶10 min，再取 Standard和Sample的200 μl 加至96well，上機測 532nm吸收波長。

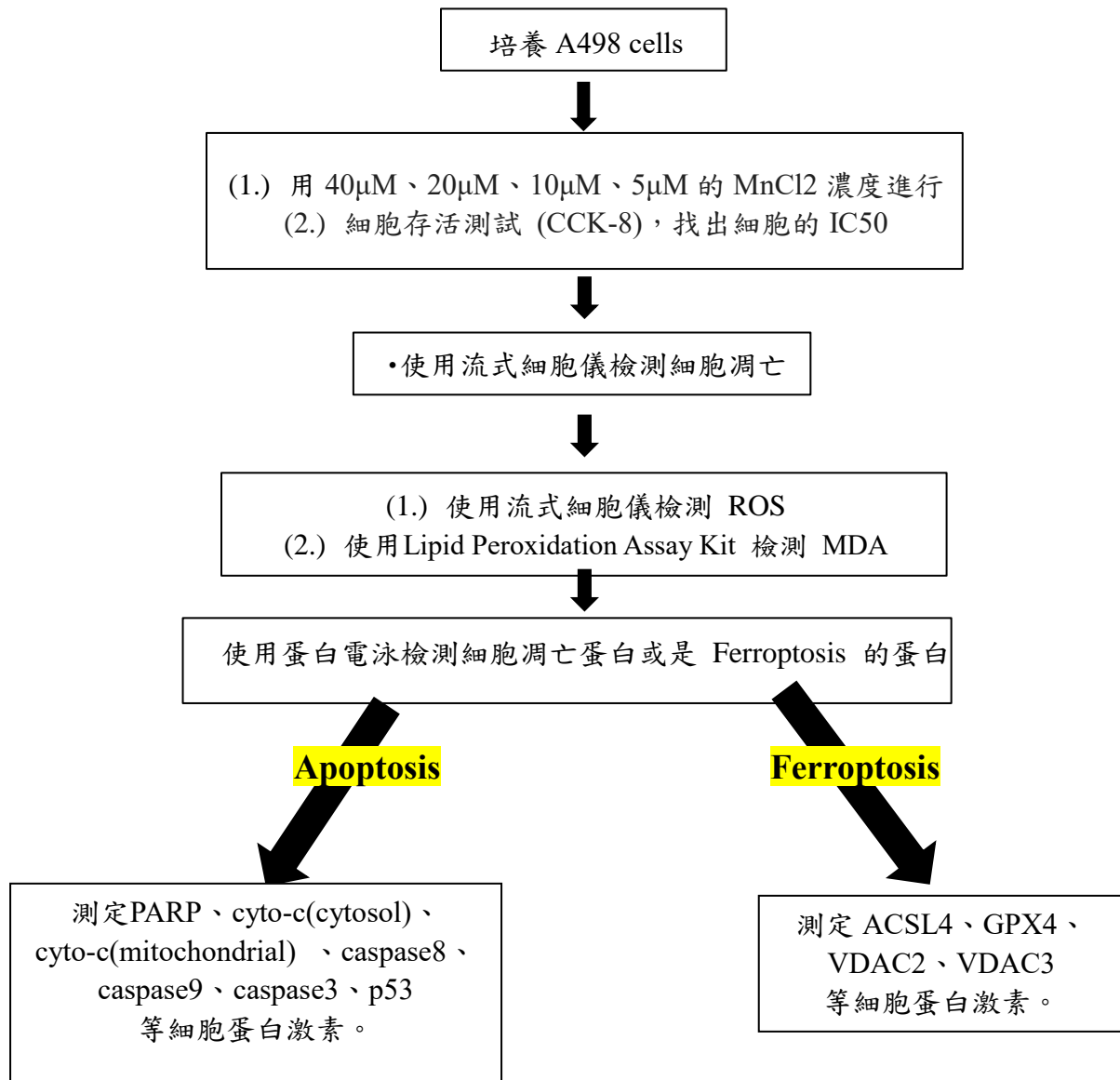
6. **萃取蛋白** (以A498 cells為例)

將A498養在10 cm dish至8、9分滿，細胞貼壁後加入 $10\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 的 MnCl_2 溶液，作用24小時後將其從培養皿收取至15cc的離心管中，離心1500 rpm 5分鐘，倒掉上清液加入1 ml PBS混合均勻後移入Eppendorf內，1500 rpm 離心5分鐘，重複清洗3次後加入300 μl 含有Protease inhibitor的RIPA Buffer，用Sonicator萃取蛋白後，離心126000 rpm, 4°C , 20min，收取含有細胞蛋白的上清液。

7. **Western blot** (以A498 cells為例)

將培養的細胞(Control、10 μ M、15 μ M、20 μ M)收集後，裂解並收集蛋白，架膠完後，分別加入load dye、marker、sample、marker在well中，用dropper把中間的running buffer補滿，進行壓上膠50V 30min，再跑下膠時調至80V 90min到白色底部，先將PVDF泡在甲醇中醒紙，之後在transfer buffer將膠夾進濾紙中，放入電泳槽在把transfer buffer倒至其中，在放入保麗龍並鋪滿冰塊，設定電流300跑90分鐘(勿動)，反應後將PVDF放入TBST保濕，把需要的蛋白band剪下，放入blocking buffer 作用一小時，換至另一個盒子，加入TBST buffer搖10分鐘，再換至另一個裝有TBST buffer的盒子，重複三次以上動作後加入相對應的primary antibody，並放在4度C的冰箱中搖一整晚，隔天用TBST洗3次，加入secondary antibody搖1小時，再用TBST洗三次，最後使用冷光螢光數位影像分析系統，判定蛋白band的深淺程度。

8. 實驗流程圖 (以A498 cells為例)



五、研究結果

1. $MnCl_2$ 溶液對A498 cells、HepG2 cells 的存活率之影響

本實驗利用4個不同濃度的 $MnCl_2$ 溶液測試其是否對A498、HepG2產生細胞存活率的影響，若有造成影響將計算出 IC_{50} 並接續後面的實驗。利用CCK-8 reagent和不同濃度 $MnCl_2$ 溶液處理12hr、24hr、48hr的A498、HepG2反應，偵測450nm下的吸光值。

從(圖9)與(圖10)顯示 $MnCl_2$ 作用12hr、24hr、48hr，不同濃度和Control相較之下皆有顯著差異，可證明 $MnCl_2$ 能抑制A498活性，其24hr後的 IC_{50} 為17.08 μM ，其48hr後的 IC_{50} 為37.5 μM ，接續做後續相關實驗。

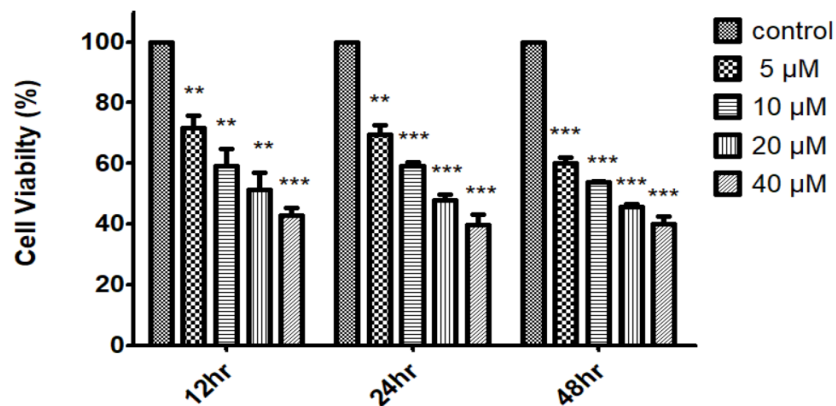


圖9: $MnCl_2$ 溶液影響A498的細胞存活率

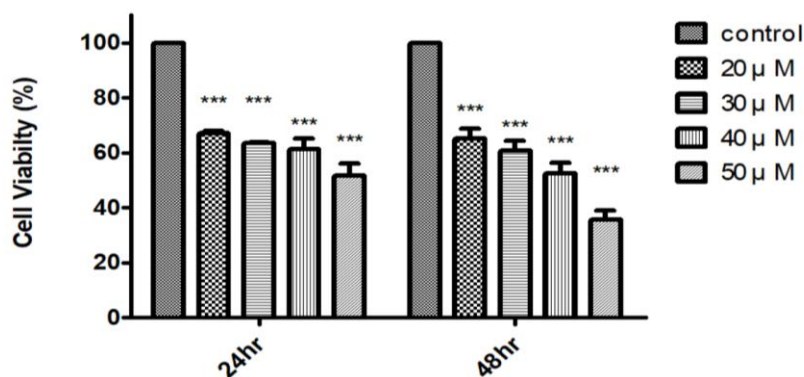


圖10: $MnCl_2$ 溶液影響HepG2的細胞存活率

使用t-test將控制組和實驗組做比較， P 值 <0.05 為顯著差異

(* , $p < 0.05$, ** , $p < 0.01$, *** , $p < 0.001$)

2. $MnCl_2$ 溶液對A498 cells、HepG2 cells的細胞凋亡之影響

本實驗目的在於利用流式細胞儀偵測 Annexin/PI螢光訊號，評估 $MnCl_2$ 是否會誘導A498的細胞凋亡，經過 $MnCl_2$ 溶液作用24hr後的 IC_{50} 為 $17.08 \mu M$ ，故實驗後續操作濃度為 $10 \mu M$ 、 $15 \mu M$ 、 $20 \mu M$ 的 $MnCl_2$ 溶液和Control做比較。評估 $MnCl_2$ 是否會誘導HepG2的細胞凋亡，經過 $MnCl_2$ 溶液作用48hr後的 IC_{50} 為 $37.5 \mu M$ ，故實驗後續操作濃度為 $30 \mu M$ 、 $37.5 \mu M$ 、 $45 \mu M$ 的 $MnCl_2$ 溶液和Control做比較。

(圖11)與(圖12)為經過不同濃度之 $MnCl_2$ 溶液作用後利用流式細胞儀分析之 A498、HepG2細胞的細胞凋亡狀態圖，可看出無顯著變化。

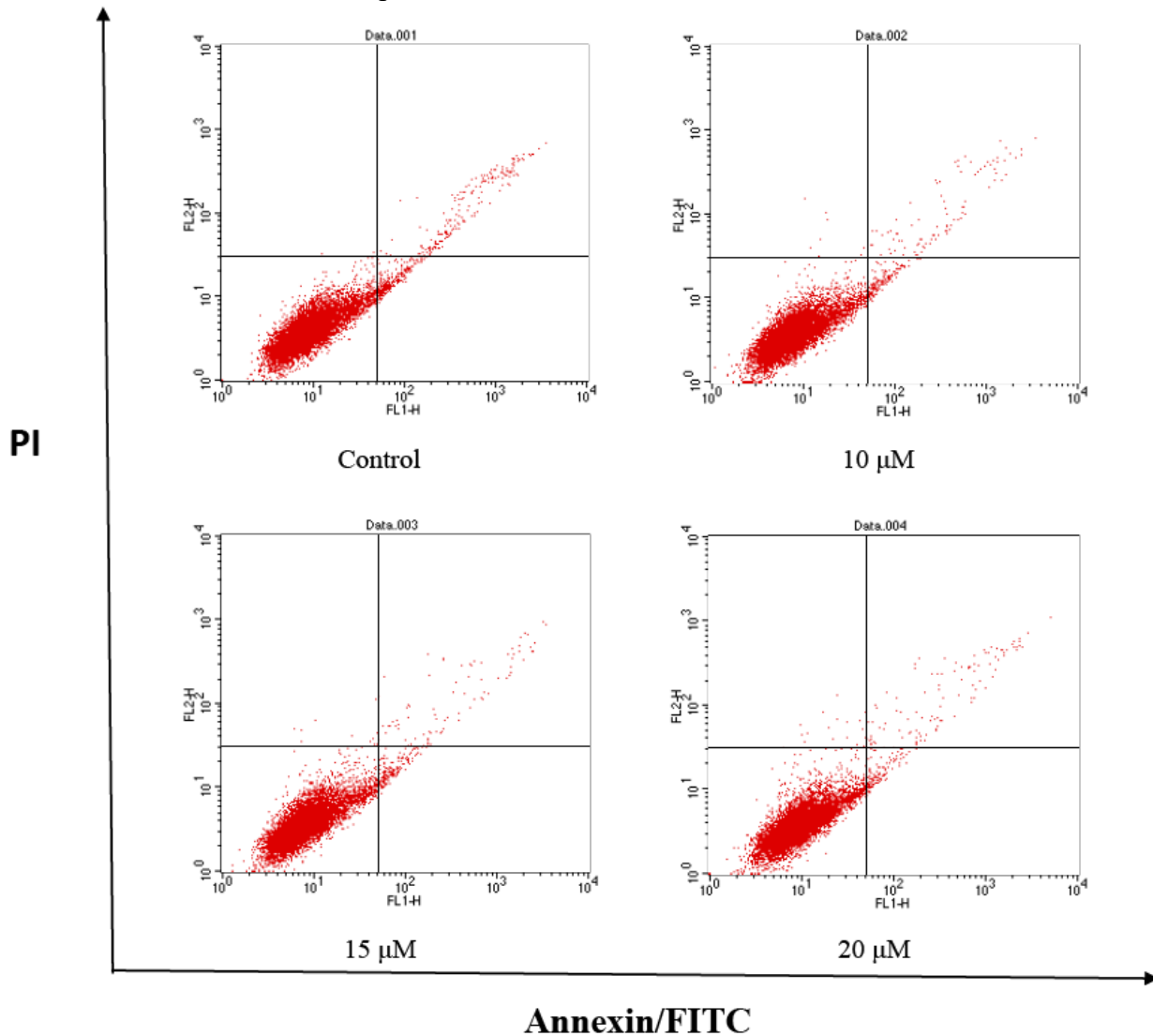


圖11： $MnCl_2$ 溶液影響 A498 的細胞凋亡

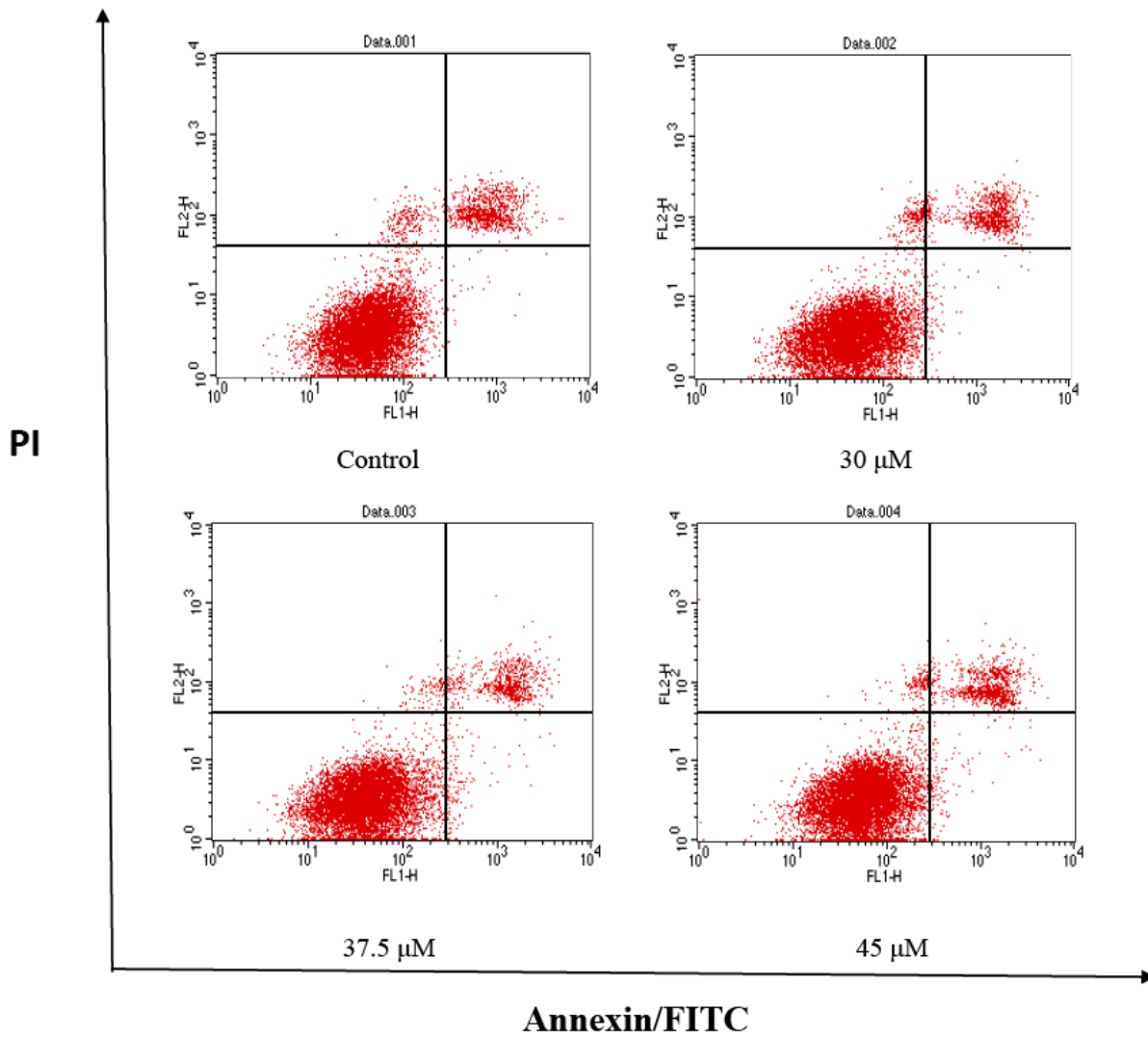


圖12: $MnCl_2$ 溶液影響 HepG2 的細胞凋亡

3. MnCl₂ 溶液對癌細胞的氧化壓力之影響

(1) MnCl₂ 溶液對A498的氧化壓力之影響

本實驗利用流式細胞儀偵測氧化壓力的藍色螢光訊號 (488nm)，評估 MnCl₂溶液是否會誘導A498產生氧化壓力。

依照Positive control和Negative control為基準，區分出氧化壓力是否產生(圖13)，從(圖14)可發現實驗組因為MnCl₂溶液的濃度提升，往右偏移並靠近 Positive control 的分佈位置，可證明MnCl₂溶液能誘導 A498產生氧化壓力，(圖15)為提升氧化壓力的百分比。

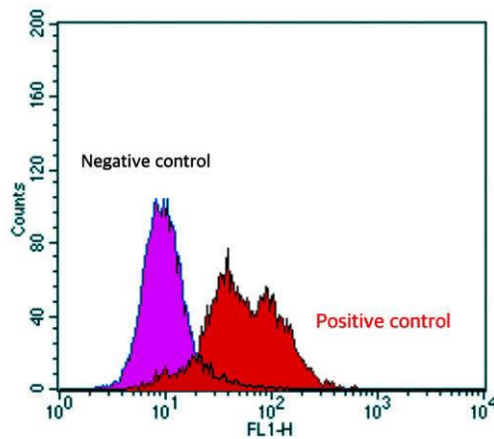


圖13 : Positive control 和 Negative control 分佈圖

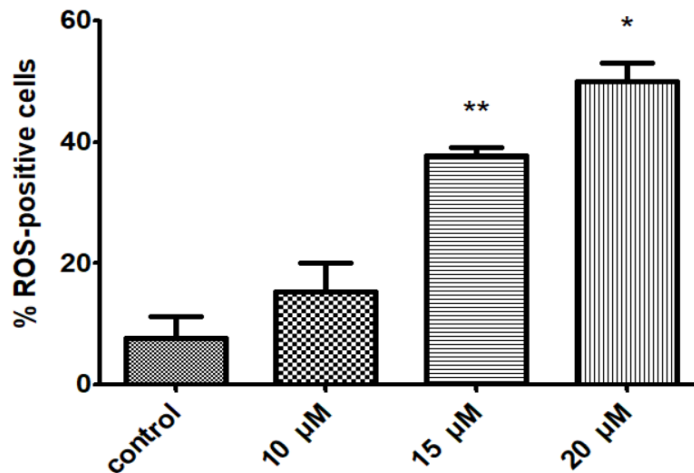


圖14：不同濃度間氧化壓力的提升

使用t-test將控制組和實驗組做比較，P值<0.05為顯著差異

(*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001)

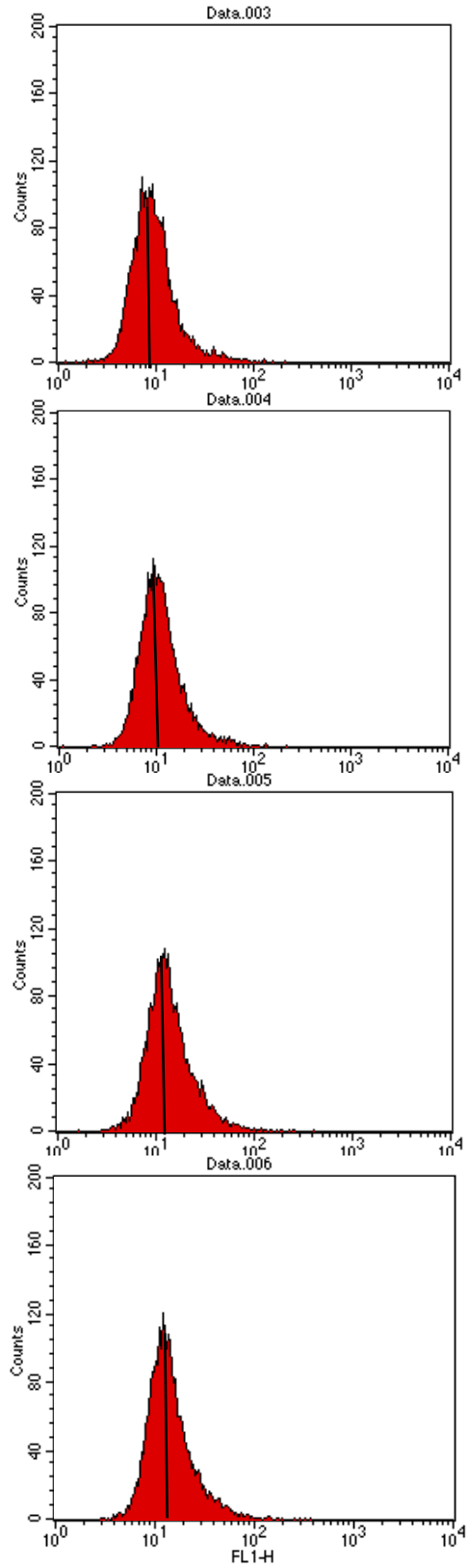


圖15：由上至下分別是 Control、10 μ M、15 μ M、20 Mm

(2) MnCl₂ 溶液對Hep2的氧化壓力之影響

本實驗利用全功能螢冷光判讀儀偵測螢光值，評估MnCl₂ 溶液能否引發HepG2產生氧化壓力。

(圖16)在37.5 μM濃度下，相較control可提升兩倍左右，其餘濃度皆有上升現象，說明MnCl₂ 溶液確實能引發氧化壓力增加。

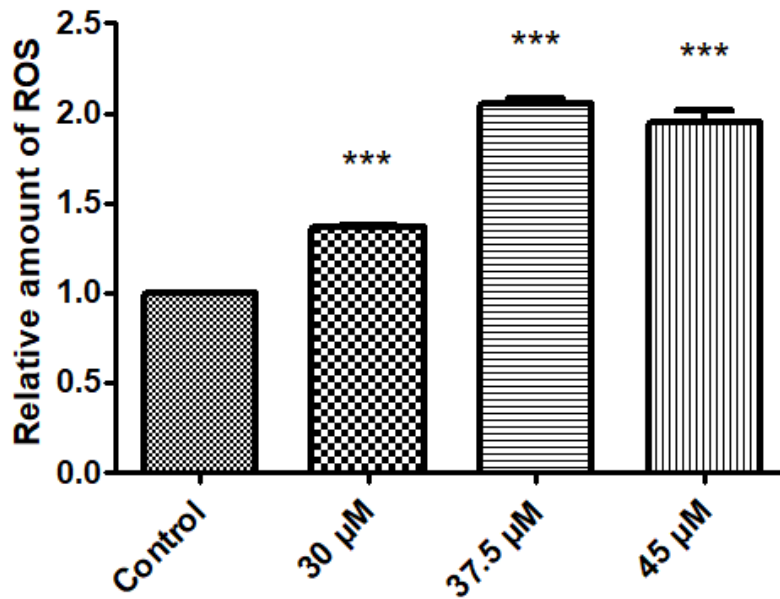


圖16：不同濃度間氧化壓力的提升

使用t-test將控制組和實驗組做比較，P值<0.05為顯著差異

(* , p<0.05, ** , p<0.01, *** , p<0.001)

4. $MnCl_2$ 溶液對A498cells、HepG2 cells的Lipid peroxidation之影響

本實驗會測定malondheyde (MDA)含量，MDA會和Thiobarbituric Acid (TBA)反應產生複合物，複合物可用532 nm偵測吸光值。

從(圖16)可看出15 μM 、20 μM 和Control相比，約提升15-20%，但依照Ferroptosis相關論文，Lipid peroxidation會成長50%以上。而(圖17)可看出37.5 μM 和Control相比，約提升10%。

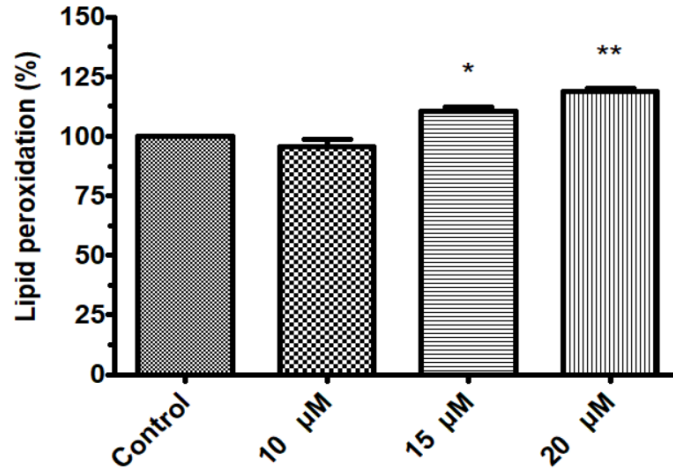


圖16: $MnCl_2$ 溶液影響 A498 的Lipid peroxidation

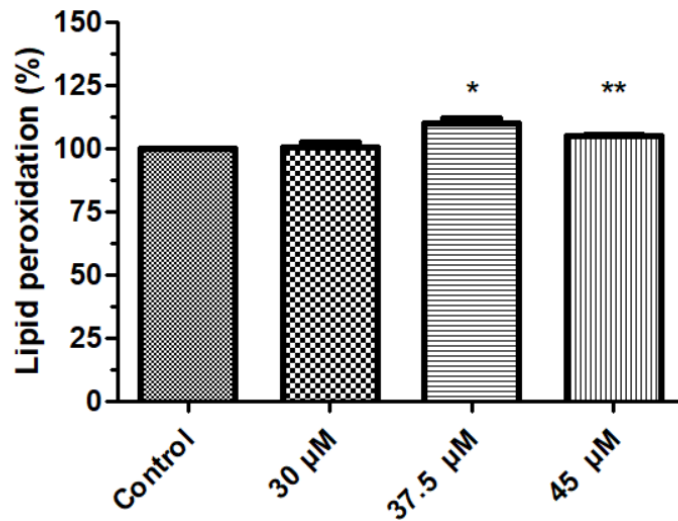


圖17: $MnCl_2$ 溶液影響 HepG2 的Lipid peroxidation

使用t-test將控制組和實驗組做比較，P值<0.05為顯著差異

(* , p<0.05, ** , p<0.01, *** , p<0.001)

5. MnCl₂ 溶液對A498cells、HepG2 cells的ACSL4蛋白之影響

ACSL4是Ferroptosis重要性的biomarker，它會使PUFA轉變成lipid peroxides，進而引發Ferroptosis發生。比對Control 和實驗組可發現ACSL4會因藥物濃度提高隨之增加，可推測藥物引發癌細胞走向Ferroptosis的路徑與Lipid peroxidation pathway有關。

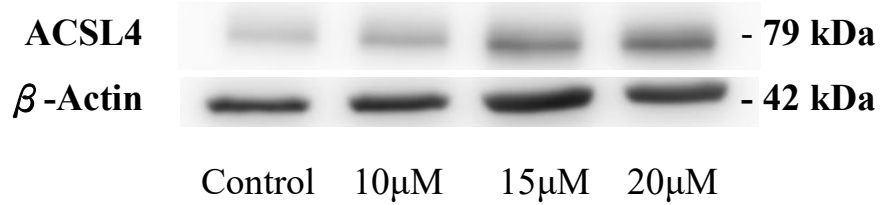


圖18 MnCl₂ 溶液對A498的ACSL4蛋白的western blot結果

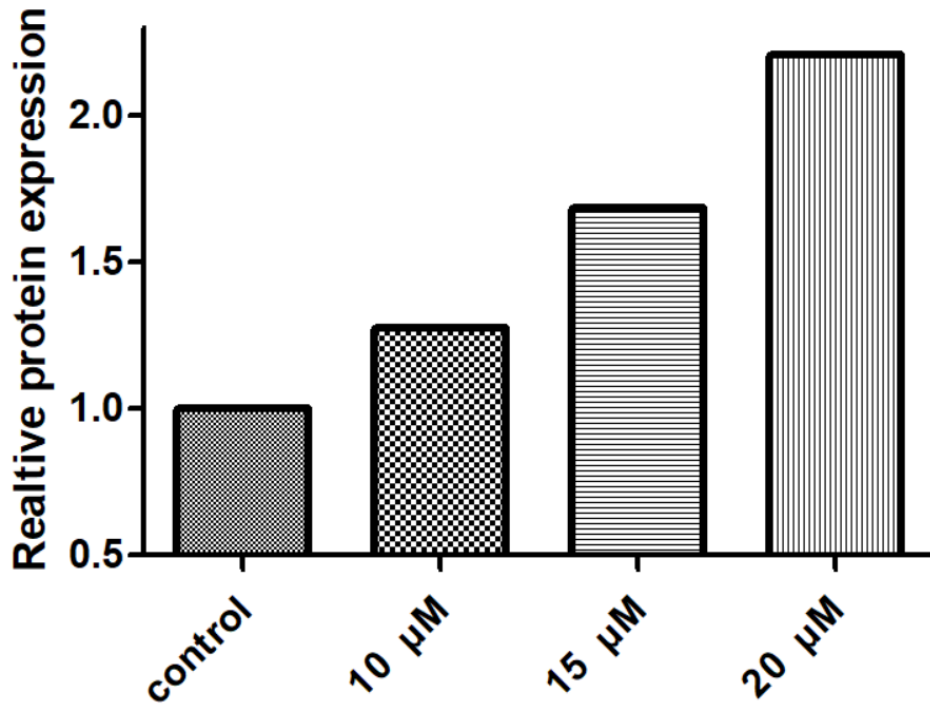


圖19 MnCl₂ 溶液對A498的ACSL4蛋白比例柱狀圖

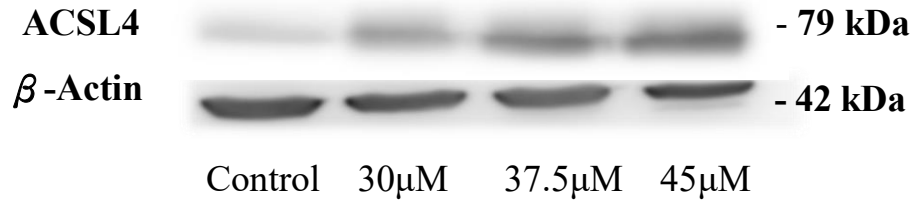


圖20 MnCl₂ 溶液對HepG2的ACSL4蛋白的western blot結果

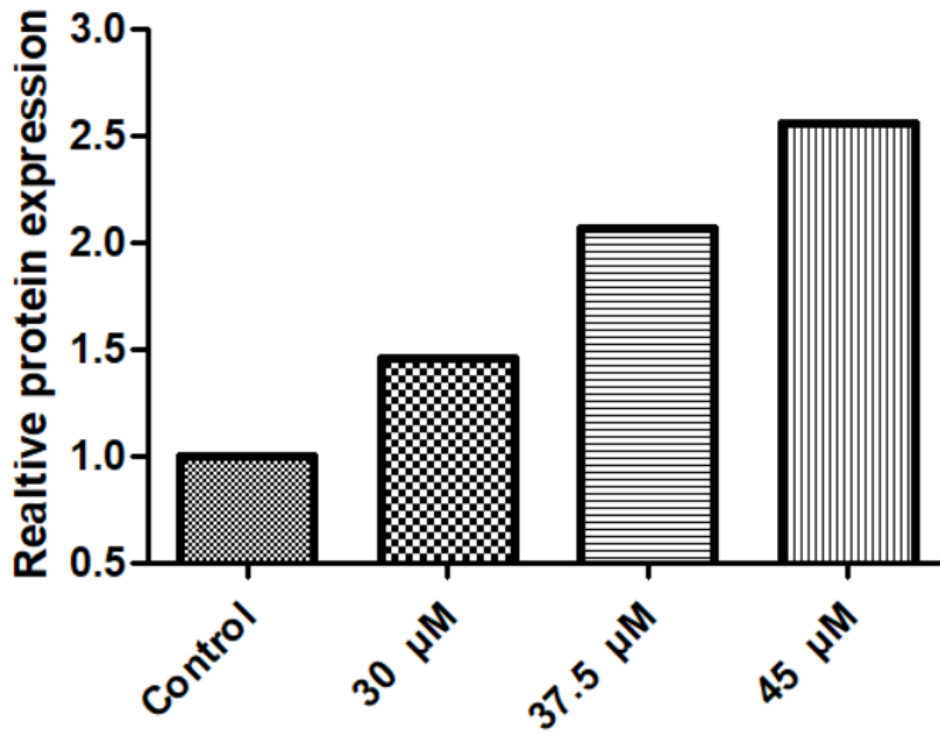


圖21 MnCl₂ 溶液對HepG2的ACSL4蛋白比例柱狀圖

6. MnCl₂ 溶液對A498cells的VDAC2蛋白之影響

VDAC2是粒線體上的通道蛋白，若VDAC2活性降低可說明改變了粒線體外膜的通透性，引發粒線體被破壞使細胞內氧化壓力增加，western blot結果並不顯著，會再進行三重複以確認Ferroptosis的分子路徑，並加做其他抗體進行western blot。

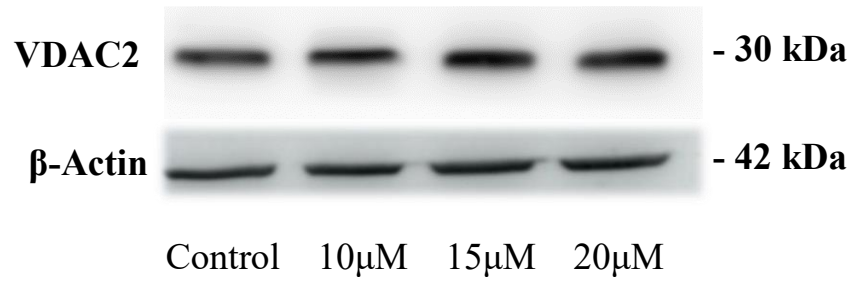


圖22 MnCl₂ 溶液對A498的VDAC2蛋白的western blot結果

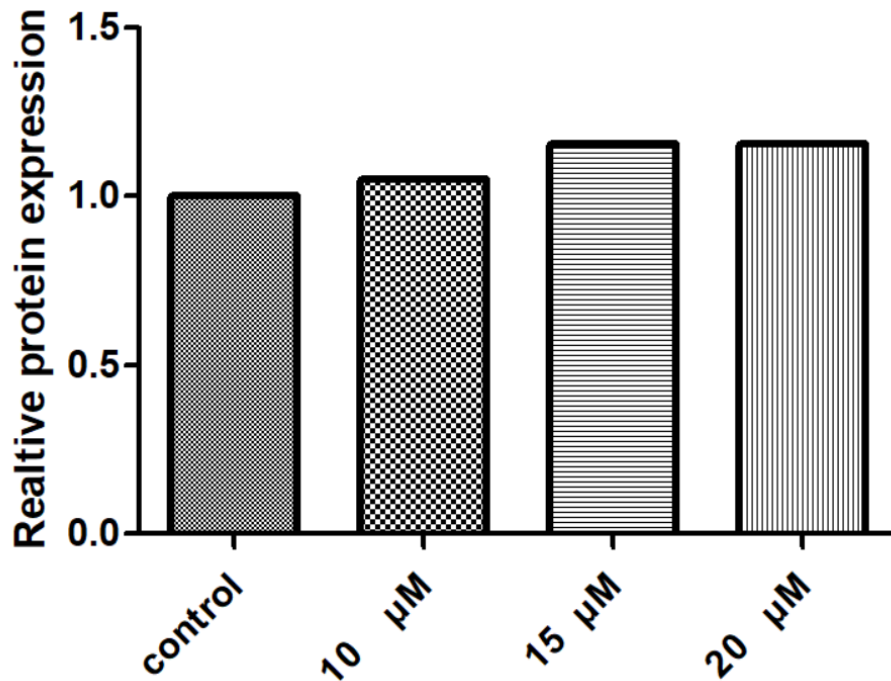


圖 23 MnCl₂ 溶液對 A498 的 VDAC2 蛋白比例柱狀圖

7. MnCl₂ 溶液對HepG2 cells的GPX4蛋白之影響

GPX4是lipid repair enzyme，可將過氧化脂質轉化為非毒性的脂質，若GPX4失活，導致過氧化脂質堆積，促使Lipid peroxidation發生，也就是Ferroptosis最具代表性的現象。

(圖25)發現45μM的MnCl₂ 溶液，導致GPX4蛋白降低約40%，可推測亞錳離子能影響Glutathione peroxidase 4 synthesis and function-related pathway，未來可針對cystine/glutamate reverse transport system Xc-做上游的分析。

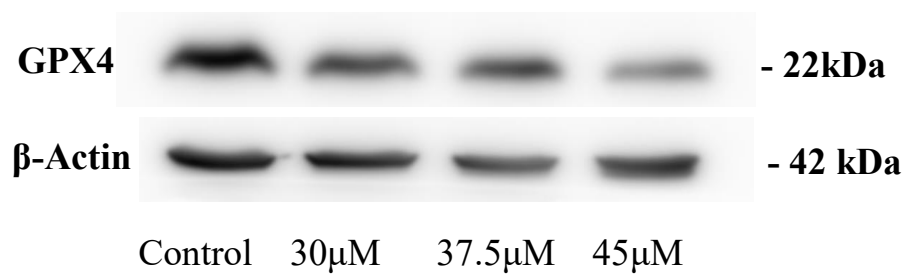


圖24 MnCl₂ 溶液對HepG2的VDAC2蛋白的western blot結果

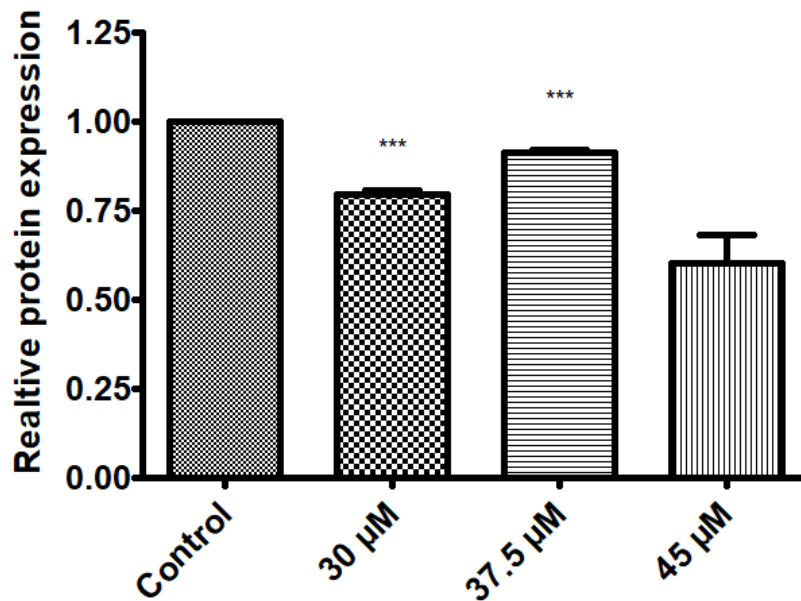


圖 25 MnCl₂ 溶液對 HepG2 的 GPX4 蛋白比例柱狀圖

六、 研究討論

依照上述的實驗數據，目前推斷細胞死亡方式非細胞凋亡，但有機會與ROS有關，MnCl₂溶液造成A498、HepG2的Lipid peroxidation影響較小，再根據西方點墨法的結果，兩種癌細胞透過藥物可使ASCL4蛋白增加，可說明引發Lipid peroxidation pathway，藥物對A498的VDAC2蛋白無明顯的改變，HepG2的GPX4蛋白有顯著的降低，推測MnCl₂溶液確實能影響Ferroptosis的主要蛋白，但分子路徑尚未明瞭，時間因素未能釐清Apoptosis和Ferroptosis相關性，後續相關研究會交給其他人做探討。粒線體Ferroptosis 的特徵是體積變小、mitochondria crista 體積減小甚至消失和粒線體外膜斷裂，後續的實驗將利用電子顯微鏡加以確認Ferroptosis的發生。透過Qingbo X等人所發表的論文[5]，Ferroptosis可促使antitumor immunity發生，利用flow cytometry偵測抗原，例如:CD 4⁺、CD 8⁺、CD 45⁺等，有明顯地上升趨勢，未來進入動物實驗可參考此實驗，進行免疫方面的研究。

七、 參考資料

1. Bodil H., Ingvar H., Andreas G., Helena T., Manganese Inhibits Viability of Prostate Cancer Cells. *Anticancer Res*, 2018. 38(1):137-145.
2. Kazuya Y., et al., Activation of protein kinase R in the manganese-induced apoptosis of PC12 cells. *Toxicology*, 2020. 442:152256.
3. Yu D., et al., G0/G1 phase arrest and apoptosis induced by manganese chloride on cultured rat astrocytes and protective effects of riluzole. *Bio Trace Elem Res*.2011 Dec;144(1-3):832-42.
4. Jia L., et al., Tumor-targeting novel manganese complex induces ROS-mediated apoptotic and autophagic cancer cell death. *Int J Mol Med*.2015; 35(3):607-16.
5. Qingbo X., et al., Manganese porphyrin-based metal-organic framework for synergistic sonodynamic therapy and ferroptosis in hypoxic tumors. *Theranostics*.2021 1; 11(4):1937-1952.
6. Rachel P Wilkie-Grantham, Shu-Ichi M., John C R., Novel phosphorylation and ubiquitination sites regulate reactive oxygen species-dependent degradation of anti-apoptotic c-FLIP protein. *J Biol Chem*.2013 3; 288(18):12777-90.
7. Yong Z., et al., Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1. *Cell Res*. 2009; 19(4):449-57.
8. Sudjit L., et al., Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Mol Biol Cell*.2013; 24(6):858-69.
9. Kim S.J., Kim H.S., Seo Y.K., Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*.2019 18;2019:5381692

10. Tao X., et al., Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy. *J Cell Mol Med.* 2019; 23(8):4900-4912.
11. Scott J.D., et al., Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012; 149(5):1060-72.
12. Matthew R. S. , Jolyn F. , Young-Mi Go , Dean P J. Redox dynamics of manganese as a mitochondrial life-death switch. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482(3):388-398.
13. Sui X., et al., RSL3 Drives Ferroptosis through GPX4 Inactivation and ROS Production in Colorectal Cancer. *Front Pharmacol.* 2018; 22; 9:1371.
14. Cheng J., Zhu Y., Xing X., Xiao J., Chen J., et al., Manganese-deposited iron oxide promotes tumor-responsive ferroptosis that synergizes the apoptosis of cisplatin. *Theranostics* 2021; 11(11):5418-5429.
15. Xiaohua Song , Dingxin Long , Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurosci.* 2020;10.3389