

# STAT3 磷酸化在铁死亡调控中的作用及其对人骨肉瘤细胞顺铂耐药的影响

王新平<sup>1,2</sup>, 王林宽<sup>1,2</sup>, 胡鹏超<sup>2</sup>, 石义华<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 武汉科技大学医学院襄阳市第一人民医院研究生联合培养基地骨科, 襄阳 441000;

湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院<sup>2</sup> 中心实验室、<sup>3</sup> 骨科, 襄阳 441000)

**摘要** 目的 探究 STAT3 磷酸化在铁死亡调控中的作用及其对人骨肉瘤细胞顺铂耐药的影响。方法 以人骨肉瘤细胞系 HOS 及其顺铂耐药细胞系 HOS/DDP 为实验对象, 顺铂(0.5、1、2、4、8、16、32 mg/L)、铁死亡激动剂 Erastin(Era)(2 μmol/L)和铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1(Fer1)(10 μmol/L)单独或联合处理。使用 CCK-8 法和细胞克隆形成实验测定不同处理组细胞活力与增殖能力; 细胞划痕实验测定细胞的迁移能力; 采用试剂盒测定细胞活性氧(ROS)、细胞内亚铁离子含量、细胞内线粒体的膜电位和功能状态、丙二醛(MDA)水平和还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)比值; 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测铁死亡相关基因的 mRNA 表达水平; 通过 Western blot 检测各组谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)、磷酸化信号传导子及转录激活子 3(p-STAT3)及信号转导和转录激活因子 3(STAT3)蛋白的表达。结果 顺铂单独处理后 HOS 细胞活力、线粒体膜电位及 GSH/GSSG 比值下降( $P < 0.01$ ), ROS 水平、亚铁离子水平及 MDA 含量升高( $P < 0.01$ ), GPX4( $P < 0.01$ )和 SLC7A11 蛋白及 p-STAT3 水平下降( $P < 0.05$ ); 联合铁死亡抑制剂 Fer1 处理可逆转上述结果( $P < 0.05$ )。在 HOS/DDP 细胞中, 铁死亡抑制基因 GPX4、FTH1、SLC7A11 和 AIFM2 较 HOS 细胞高( $P < 0.05$ ), 而铁死亡促进基因 ACSL4、PTGS2 则较 HOS 细胞低( $P < 0.05$ ), 顺铂单独处理引起的细胞活力及线粒体膜电位下降程度、ROS、亚铁离子及 MDA 水平的升高程度均低于 HOS 细胞, SLC7A11 蛋白含量变化不明显; 但联合铁死亡激动剂 Era 处理后, HOS/DDP 细胞的活力、线粒体膜电位、GSH/GSSG 比值均下降( $P < 0.05$ ), 且 p-STAT3、GPX4 及 SLC7A11 的蛋白水平也降低( $P < 0.05$ )。结论 激活由 p-STAT3 参与调控的铁死亡过程可以增强 HOS/DDP 对顺铂的敏感性。

**关键词** 人骨肉瘤细胞; 铁死亡; 顺铂; 耐药; STAT3 蛋白; p-STAT3 蛋白

**中图分类号** R 738.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1670-12

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.014

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是儿童和青少年中最常见的原发性骨恶性肿瘤,手术联合化疗可显著提高中晚期患者生存率<sup>[1]</sup>。顺铂(cisplatin, Cis)是 OS 治疗中的常用化疗药物,但耐药性的发生常导致化疗失败<sup>[2]</sup>。Cis 可通过诱发氧化应激产生细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)造成细胞死亡,而研究<sup>[2]</sup>显示抗氧化系统的过度激活能够通过增加抗氧化水平导致 Cis 耐药。Fu et al<sup>[3]</sup> 研究显示,抑制核因子红细胞 2 相关因子 2/Kelch 样 ECH 关联蛋白 1/溶质载体家族 7 成员 11(nuclear factor erythroid 2-related factor 2/Kelch-like ECH-associated protein 1/xCT, Nrf2/Keap1/xCT) 抗氧化信号通路可

增强胃癌细胞的 Cis 敏感性。铁死亡是由铁依赖性脂质过氧化介导的细胞死亡形式,研究<sup>[4]</sup>证实其在肿瘤耐药中发挥重要作用。信号传导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是一个兼具信号转导和转录激活功能的癌基因,STAT3 与肿瘤增殖、转移等密切相关<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>显示柚皮素抑制 STAT3,阻断微粒体谷胱甘肽 S-转移酶 2(microsomal glutathione S-transferase 2 MGST2)的表达,诱导 OS 细胞铁死亡。该研究主要探讨磷酸化信号传导子及转录激活子 3(phosphorylated-STAT3, p-STAT3)与铁死亡过程在 HOS/DDP 细胞 Cis 耐药中的作用及其调控机制,为 OS 临床诊疗策略的开发提供理论支撑。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料和仪器** 人骨肉瘤细胞系 HOS 及其 Cis 耐药细胞系 HOS/DDP(均由实验室保藏); DMEM 培养基、胰蛋白酶、青-链霉素溶液[货号:

2025-07-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81703015)

作者简介: 王新平,男,硕士研究生;

石义华,男,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: yihua19@163.com

12491023、25200056、15070063,赛默飞世尔科技(上海)有限公司]; Cis、CCK-8 及 Hoechst 33258 核染剂(货号: HY-17394、HY-K0301、HY-15558,美国 Med-ChemExpress 公司); 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(H2DCFDA) ROS 检测试剂盒、线粒体红色荧光探针(MitoTracker Red CMXRos)、脂质氧化(reactive oxygen species, MDA) 检测试剂盒、谷胱甘肽(glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽(glutathione disulfide, GSSG) 检测试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号: S0033S、C1035-50 $\mu$ g、S0131S、S0053、P0012,上海碧云天生物技术股份有限公司); 磷酸酶抑制剂及蛋白裂解液(货号: P1045、P0013,上海碧云天生物技术股份有限公司); 细胞内亚铁离子荧光探针(货号: F374,上海东仁化学科技有限公司); PAGE 凝胶快速制备试剂盒(货号: PG113,广州科荣生物有限公司); 磷酸化信号转导与转录激活因子 3(Y705 位点) 兔单克隆抗体 [phospho-signal transducer and activator of transcription 3 (Tyr705) rabbit monoclonal antibody, p-STAT3 (Tyr705) Rabbit mAb]、信号转导与转录激活因子 3 兔多克隆抗体(signal transducer and activator of transcription 3 rabbit polyclonal antibody, STAT3 Rabbit pAb)、溶质载体家族 7 成员 11/胱氨酸-谷氨酸反向转运体轻链兔单克隆抗体(solute carrier family 7 member 11 / cystine/glutamate antiporter light chain rabbit monoclonal antibody, SLC7A11/xCT Rabbit mAb)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 兔单克隆抗体(glutathione peroxidase 4 rabbit monoclonal antibody、GPX4 Rabbit mAb) 及 HRP 标记的山羊抗兔和山羊抗鼠抗体(货号: AP0705、A1192、A2413、A25009、AE104、AE028,湖北爱博泰克生物技术有限公司); PVDF 膜(货号: ISEQ00010,广州唐穗科技有限公司); 逆转录及 RT-qPCR 试剂(货号: RK20428-100 RXN) 购自爱博泰克生物科技(武汉)有限公司,引物,包括铁蛋白重链 1(ferritin heavy chain 1, FTH1)、GPX4、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)、SLC7A11、前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 和线粒体凋亡诱导因子 2(apoptosis-inducing factor mitochondria-associated 2, AIFM2) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。酶标仪(型号: SpectraMax i3x) 购自美谷分子仪器(上海)有限公司; 倒置荧光显微镜(型号: IX73) 购自奥林巴斯(日本)公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞均在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。HOS 细胞培养于 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素混合双抗的 DMEM 中, HOS/DDP 细胞基于以上的完全培养加入 1 mg/L Cis 维持耐药。待细胞生长到 80% 收集细胞,进行蛋白和 RNA 的提取。

**1.2.2 实验分组** 实验分组①: HOS 细胞分为空白对照组、不同浓度的 Cis (0.5、1、2、4、8、16 mg/L)、铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 组(10  $\mu$ mol/L)、Cis (4 mg/L) 联合 Ferrostatin-1 (10  $\mu$ mol/L) 组。实验分组②: HOS/DDP 细胞分为空白对照组、不同浓度的 Cis (1、2、4、8、16、32 mg/L)、铁死亡激活剂 Erastin 组(2  $\mu$ mol/L)、Cis (4 mg/L) 联合 Erastin 组(2  $\mu$ mol/L)。

**1.2.3 CCK-8 法测定细胞活力** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞铺于 96 孔板细胞培养箱中培养 12~24 h。HOS 细胞经 Cis (0.5、1、2、4、8、16 mg/L) 处理 24、48 h,按实验分组①处理 48 h; HOS/DDP 细胞经 Cis (1、2、4、8、16、32 mg/L) 处理 24、48 h,按实验分组②处理 48 h,培养基作空白对照。处理结束后换液,加入 10  $\mu$ L CCK-8 和 90  $\mu$ L 完全培养基的混合液,放入摇床避光孵育 1 h。酶标仪测量 450 nm 处的光密度(optical density, OD) 值,计算半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。IC<sub>50</sub> = Anti-Log [B + (50 - B) / (A - B)]  $\times$  C (A 表示 >50% 药物浓度的对数值; B 表示 <50% 药物浓度的对数值; C 为稀释倍数的对数值)。

**1.2.4 细胞划痕实验** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞在 6 孔板中培养,直到形成融合的单层。接下来,用 200  $\mu$ L 灭菌枪头,在每个孔的中心创建 1 个干净的划痕伤口。随后,洗去漂浮的细胞,按实验分组加入新鲜无血清 DMEM 培养基。然后将 6 孔板置于培养箱中孵育,使细胞能够迁移。每个伤口在预定的时间间隔(24 h 和 48 h) 拍照,并使用 ImageJ 软件确定细胞迁移率。迁移率(%) = (初始划痕面积 - 最终划痕面积) / 初始划痕面积  $\times$  100 %。

**1.2.5 细胞克隆形成实验** 将细胞以 800 个细胞/孔接种在 6 孔板中,并用不同浓度 Cis 处理。当对照组形成可见细胞集落时,使用结晶紫对细胞染色,并通过 ImageJ 软件对集落数量进行分析。

**1.2.6 ROS 检测** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞接种到 24 孔板中培养 24 h 后,细胞贴壁密度达到 42%,按实验分组处理培养 48 h 后,换液并用 PBS 洗涤 2 遍,随后加入 ROS 绿色荧光探针标记细胞内的活性

氧,20 min 后再次洗涤 2 次。使用荧光显微镜观察并拍照记录实验结果。

**1.2.7 GSH/GSSG 检测** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞铺于 6 孔板,按实验分组处理 48 h 后,根据 GSH/GSSG 试剂盒说明书操作步骤,使用酶联免疫检测仪波长 412 nm 处检测各孔的 OD 值,然后通过总 GSH 标准曲线和 GSSG 标准曲线计算出总 GSH 及相对应的 GSSG 的含量。总 GSH 定义为  $GSH + GSSG \times 2$ ,所以  $GSH = \text{总 GSH} - GSSG \times 2$ 。

**1.2.8 脂质氧化 MDA 检测** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞铺于 6 孔板,按实验分组处理培养 48 h 后,根据 MDA 试剂盒说明书操作步骤,用 SpectraMax i3x 酶标仪测定其在 532 nm 处的 OD 值。最后,以蛋白质含量为归一化方法,计算每个样品中的 MDA 含量。

**1.2.9 线粒体红色荧光探针检测** HOS 和 HOS/DDP 细胞铺于 24 孔板中培养,细胞贴壁密度达到 42% 时,按实验分组处理 48 h,弃旧培养液,PBS 洗 2 遍,使用 MitoTracker Red CMXRos 试剂盒内工作液,培养箱中避光孵育 20 min,Hoechst 染细胞核后使用荧光显微镜观察线粒体红色荧光探针标记的细胞内线粒体的状态并拍照。

**1.2.10 亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)的检测** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞接种到 24 孔板中培养 24 h 后,细胞贴壁密度达到 42%,按实验分组处理 48 h 后,换液洗 2 遍,用 Hoechst 染料标记细胞核,培养箱内放置 2 min,换液洗 2 遍;加入 200 μL 胞内亚铁离子荧光探针工作液(1 μmol/L FerroOrange 溶液),细胞置于培养箱中孵育 30 min。使用荧光显微镜在固定倍数下观察并记录。

**1.2.11 Western blot** 将细胞铺板,生长至 70% 汇合度,然后细胞按分组处理后,在磷酸化蛋白裂解液下低温裂解细胞。取上清液加入相应量的 Loading Buffer,混匀后 100 °C 煮蛋白 10 min,将蛋白样品通过 SDS-PAGE 在 10% ~ 12% 凝胶上分离,转移到聚偏氟乙烯膜上,并用一抗和二抗进行孵育。使用以下一抗: p-STAT3 (Tyr705) Rabbit mAb(1 : 500)、STAT3 Rabbit pAb(1 : 2 500)、SLC7A11/xCT Rabbit mAb(1 : 1 000)、GPX4 Rabbit mAb(1 : 4 000),抗 GAPDH 兔单克隆抗体(Anti-GAPDH Rabbit Monoclonal Antibody, Anti-GAPDH Rabbit mAb)(1 : 10 000) 用作样本对照。增强化学发光法检测蛋白条带并通过 ImageJ 软件对蛋白条带灰度进行测量,统计结果。

**1.2.12 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR)** 将 HOS 和 HOS/DDP 细胞铺于 6 孔板,按照实验分组处理结束后,弃去培养基,加总 RNA 抽提试剂( TRIzol) 裂解细胞,转至 EP 管(1.5 mL)中,进行细胞 RNA 的提取,并进行 RNA 逆转录及荧光定量扩增。目标基因的相对表达量利用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  公式进行计算。全文所用引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列  
Tab.1 Sequences of the primers for RT-qPCR

Name	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	R: GGCTGTTGTCATACCTCTCATGG	
SLC7A11	F: TGGAGATCATGGGGAGTCTG	193
	R: AAGAAAACCTGGTCCGGTGAA	
GPX4	F: GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC	100
	R: CCGAACTGGTTACACGGGAA	
AIFM2	F: GTGAGCGGCTGAGCAATCT	122
	R: CTTGATGCCGGTGACAGAAA	
PTGS2	F: TAAGTCCGATTGTACCCCGAC	250
	R: TTTGTAGCCATAGTCAGCATTGT	
FTH1	F: CCCCATTFTGTGTACTTCAT	181
	R: GCCCGAGGCTTAGCTTTCATT	
ACSL4	F: CATCCCTGGAGCAGATACTCT	96
	R: TCACTTAGGATTTCCCTGGTCC	

**1.2.13 统计学处理** 利用 GraphPad Prism 9 软件进行分析。每项试验均独立重复 3 次,结果以均数 ± 标准差表示。使用 *t* 检验比较两组之间的差别;单因素方差分析(one-way ANOVA)用于多组间比较。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 调控铁死亡对 HOS/DDP 细胞耐药的影响

如图 1A、1B 所示,HOS 细胞在不同浓度 Cis 处理 24 h 和 48 h 后,细胞活力随着时间和浓度的增加下降( $F_{趋势} = 25.41, 58.25, P < 0.01$ ),IC<sub>50</sub> 分别为 8.45 mg/L 和 1.75 mg/L;相较于亲本细胞,HOS/DDP 细胞在不同浓度 Cis 处理 48 h 后,相同浓度下细胞活力下降程度明显减少,IC<sub>50</sub> 为 8.02 mg/L,耐药指数大于 4(耐药细胞系的 IC<sub>50</sub> 与敏感细胞系 IC<sub>50</sub> 的比值)。图 1C 显示相同浓度 Cis 处理下的细胞克隆形成能力 HOS/DDP 细胞克隆形成能力高于 HOS 细胞;图 1D 结果显示,相较 HOS 细胞,相同浓度 Cis 处理条件下,HOS/DDP 细胞迁移能力也较高,上述结果提示 HOS/DDP 细胞较 HOS 细胞具有明显的 Cis 抗性。在 HOS 细胞中,Cis 联合 Fer1 组比 Cis 组细胞活力有所上升( $t = 3.404, P < 0.05$ )。见图 1E。

在 HOS/DDP 细胞中, Cis 联合 Era 组细胞活力比 Cis 组细胞活力明显下降 ( $t = 4.251, P < 0.01$ )。见图 1F。

**2.2 铁死亡对 HOS 和 HOS/DDP 细胞 ROS 水平的调节效应** 比较 HOS 及 HOS/DDP 细胞在实验分组处理后细胞中 ROS 的生成情况, 在 1 mg/L 和 2 mg/L Cis 处理后, HOS/DDP 细胞的 ROS 绿色荧光表达上升幅度明显低于 HOS 细胞; 在 2 mg/L Cis 处

理 48 h 后, HOS 细胞的 ROS 荧光表达上升比例是 HOS/DDP 细胞的 1.8 倍, 见图 2A、2B。与 Cis 组相比, Cis 联合 Fer1 组在 HOS 细胞中 ROS 荧光强度明显减弱 ( $t = 5.250, P < 0.01$ )。见图 2C。在 HOS/DDP 细胞中, Cis 联合 Era 组所产生的 ROS 平均荧光强度是 Cis 组的 1.68 倍 ( $t = 5.696, P < 0.01$ )。见图 2D。

**2.3 铁死亡影响 HOS 和 HOS/DDP 细胞线粒体**

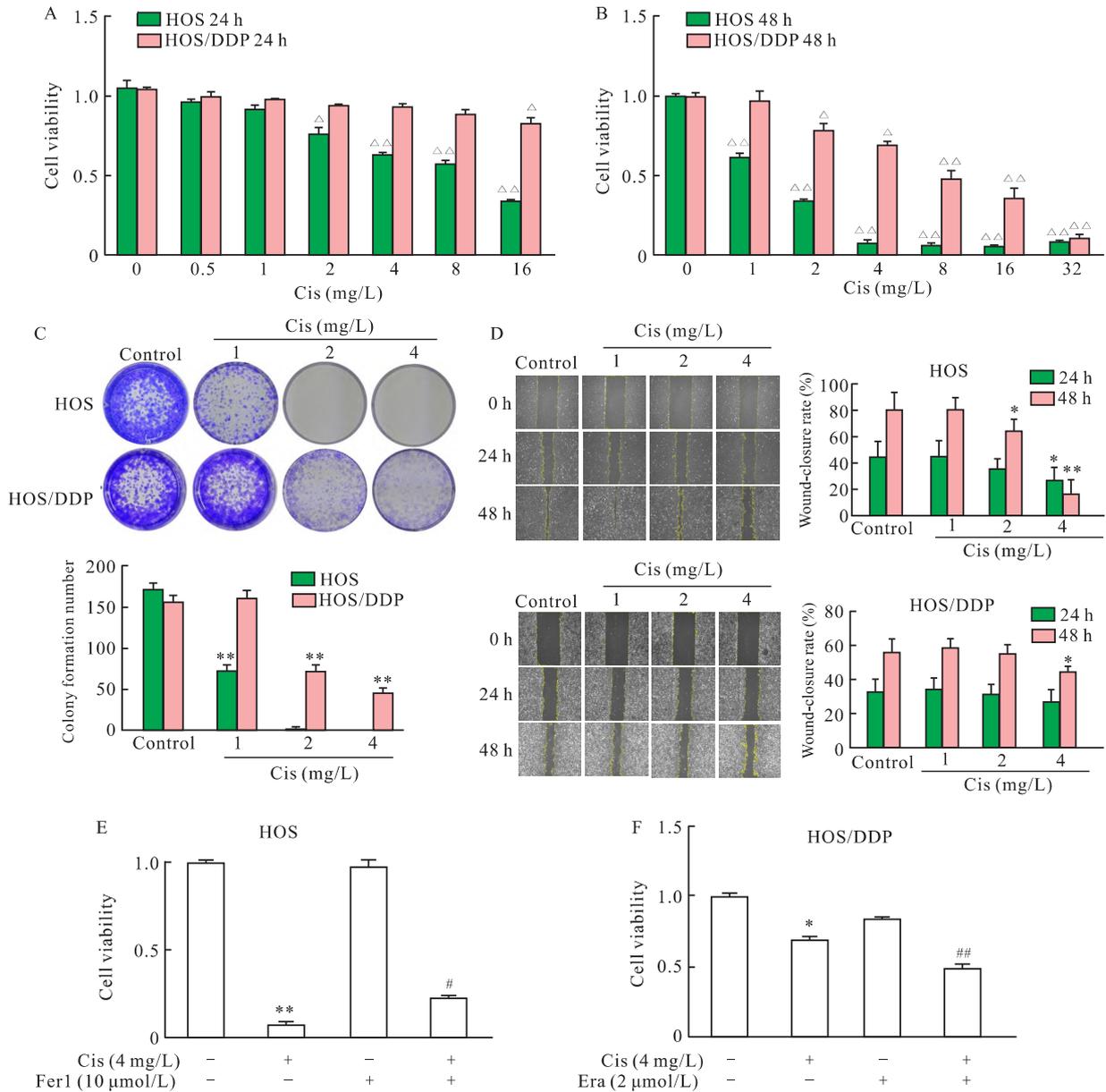


图 1 各组 HOS 和 HOS/DDP 细胞细胞活力的比较 ×100

Fig. 1 Comparison of cell viability among various groups of HOS and HOS/DDP Cells ×100

A, B: Viability of HOS and HOS/DDP cells treated with varying Cis concentrations (24 h/48 h) assessed by CCK-8 assay; C, D: Colony formation, cell migration, and quantitative analysis in Cis-treated HOS and HOS/DDP cells; E, F: Cell viability after 48 h Cis monotherapy or combination therapy with Era/Fer1 (CCK-8);  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 0 mg/L of the same type of cells; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group of the same type of cells; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Cis group.

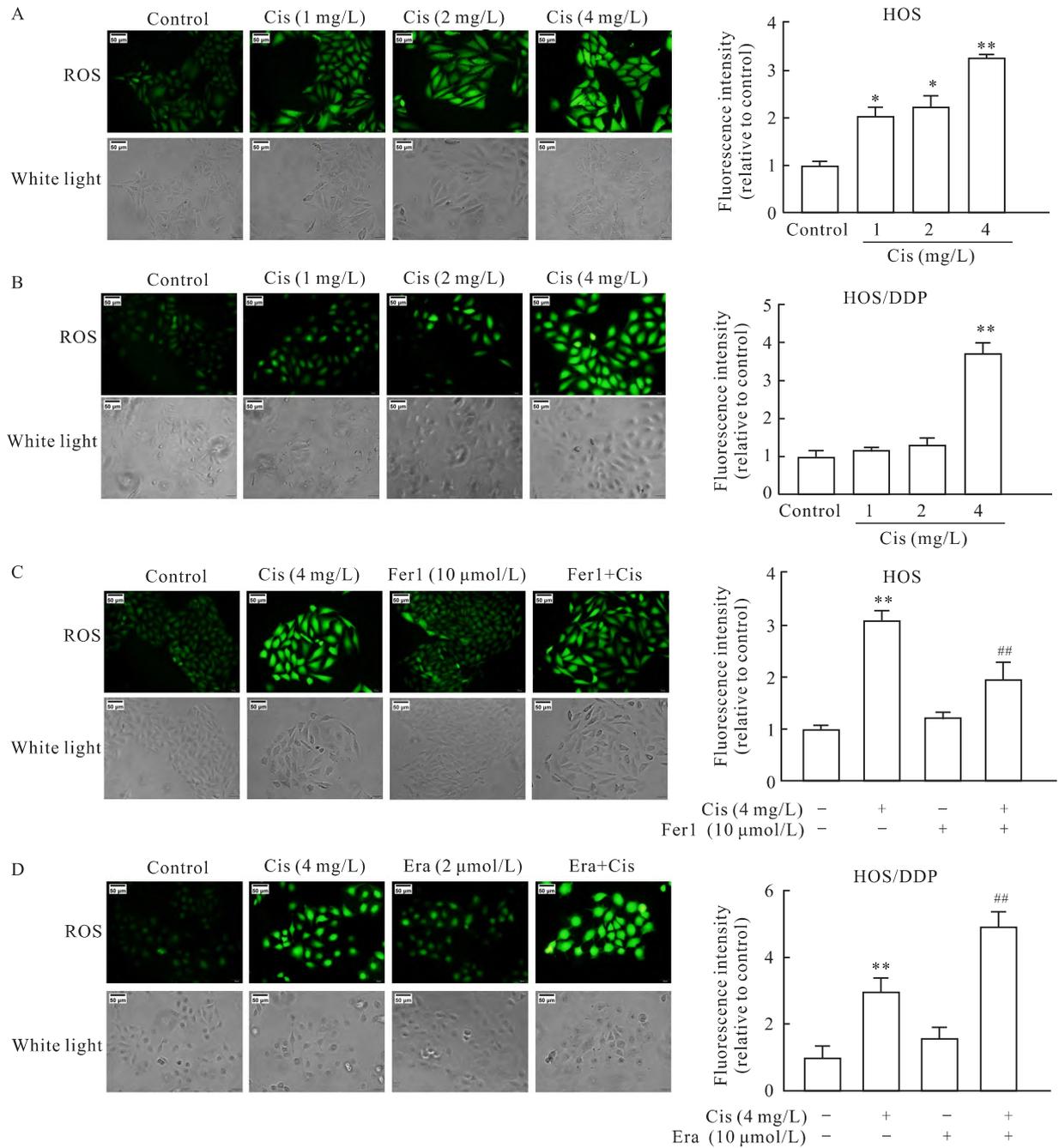


图2 H2DCFDA 探针检测各组 HOS 和 HOS/DDP 细胞 ROS 水平 ×200

Fig.2 The ROS levels of HOS and HOS/DDP cells in each group were detected by H2DCFDA probe ×200

A, B: ROS levels in HOS and HOS/DDP cells treated with different concentrations of Cis for 48 h; C, D: ROS levels in HOS and HOS/DDP cells treated with different concentrations of Cis, Fer1 and Era for 48 h; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ##  $P < 0.01$  vs Cis group.

**功能的作用** 比较实验分组处理后 HOS 及 HOS/DDP 细胞的线粒体功能,图 3A、3B 显示: 在相同 Cis 浓度处理下, HOS/DDP 细胞的线粒体 MitoTracker 平均荧光强度下降幅度偏低, 2 mg/L Cis 处理 48 h 后, HOS 细胞平均荧光强度降低 50% ( $t = 5.471, P < 0.01$ ), 而 HOS/DDP 细胞平均荧光强度仅下降

10%。在 HOS 细胞中, Cis 联合 Fer1 组细胞的红色荧光强度比 Cis 组升高 ( $t = 4.161, P < 0.01$ )。见图 3C。在 HOS/DDP 细胞中, Cis 联合 Era 组比 Cis 组红色荧光强度则有所下降 ( $t = 3.741, P < 0.05$ )。见图 3D。

#### 2.4 铁死亡影响 HOS 和 HOS/DDP 细胞内 $Fe^{2+}$

含量 比较 HOS 及 HOS/DDP 细胞在实验分组处理后细胞中  $Fe^{2+}$  的含量。HOS 细胞内  $Fe^{2+}$  红色荧光强度随着 Cis 浓度的增加而增加 ( $F_{趋势} = 37.29, P < 0.01$ ), 说明细胞内不稳定铁明显上升; 与对照组相比, Cis 组 (2 mg/L) 的细胞平均红色荧光强度增加 1.1 倍。见图 4A。而在 HOS/DDP 细胞中, Cis 组 (2 mg/L) 的细胞平均红色荧光强度仅增加 0.45 倍。见图 4B。以上结果表明 HOS/DDP 的 Cis 耐药可能

与铁死亡有关。在 HOS 细胞中, Cis 联合 Fer1 组与 Cis 组相比荧光减弱 ( $t = 4.874, P < 0.01$ )。见图 4C。在 HOS/DDP 细胞中, 与 Cis 组相比, Cis 联合 Era 组的细胞  $Fe^{2+}$  红色荧光强度上升 0.31 倍 ( $t = 4.025, P < 0.01$ )。见图 4D。

**2.5 Cis 处理后 HOS 和 HOS/DDP 细胞铁死亡相关基因的差异表达** 如图 5 结果显示, 相较于 HOS 细胞, 铁死亡抑制基因 *GPX4*、*FTH1*、*SLC7A11* 和

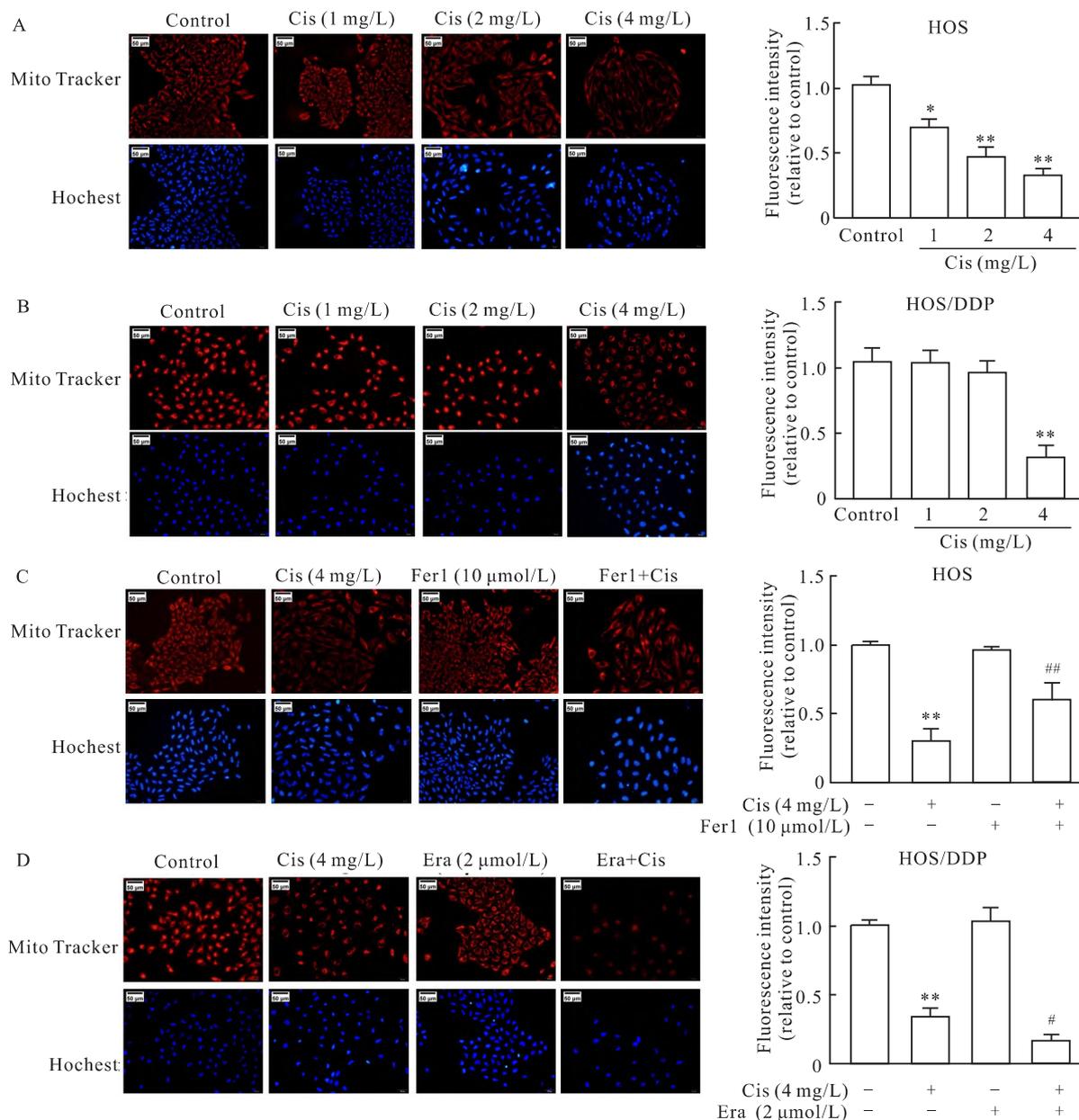


图3 各组 HOS 和 HOS/DDP 细胞线粒体功能的比较 ×200

Fig. 3 Comparison of mitochondrial function across experimental groups of HOS and HOS/DDP Cells ×200

A, B: Mitochondrial mass in HOS and HOS/DDP cells treated with different concentrations of Cis for 48 h, measured by MitoTracker Red probe; C, D: Mitochondrial mass in HOS and HOS/DDP cells treated with different concentrations of Cis, Fer1 and Era for 48 h, measured by MitoTracker Red probe; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Cis group.

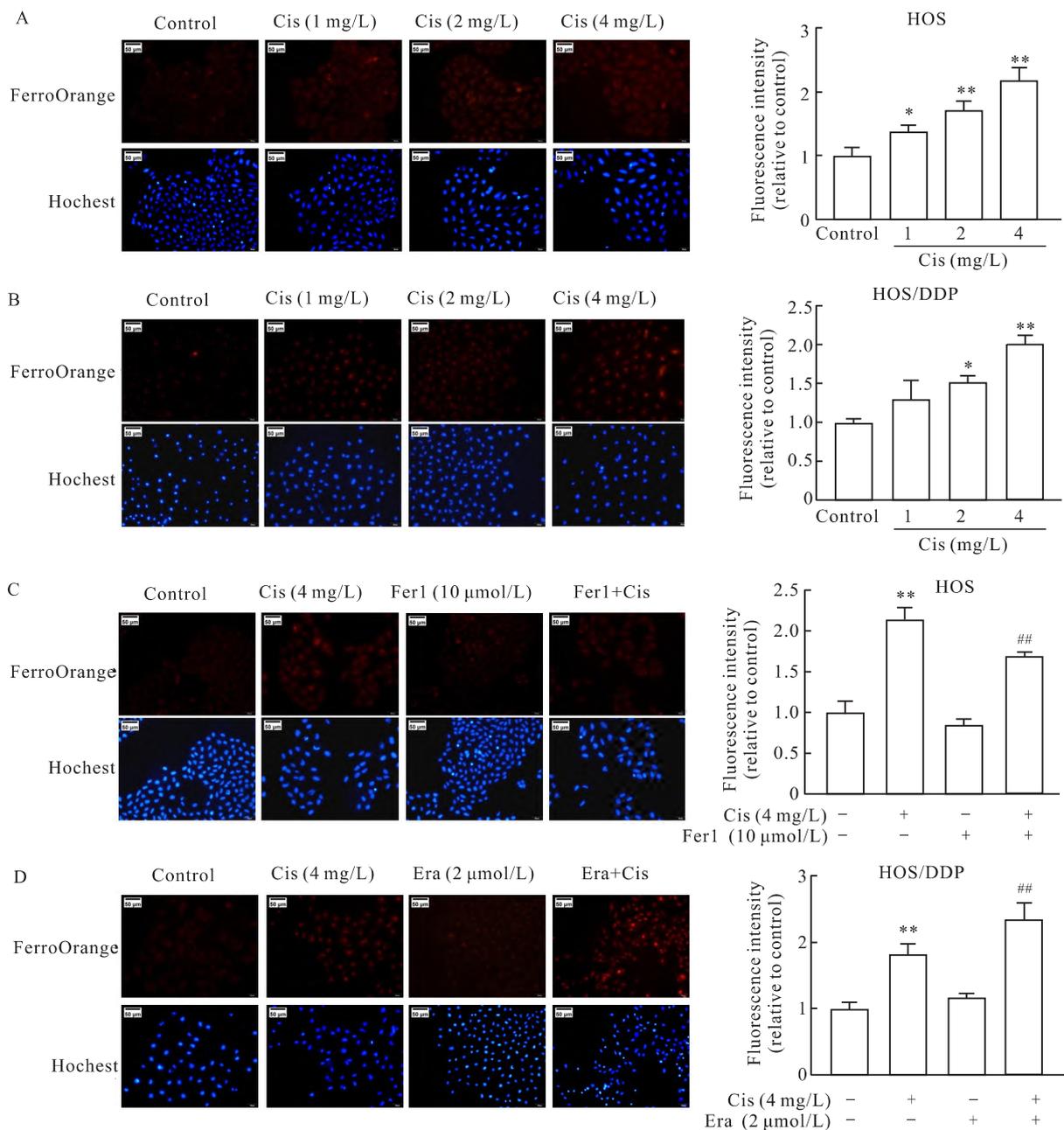


图4 各组 HOS 和 HOS/DDP 细胞亚铁离子含量的比较 ×200

Fig. 4 Comparison of ferrous iron levels among various experimental groups of HOS and HOS/DDP Cells ×200

A, B:  $Fe^{2+}$  levels in HOS and HOS/DDP cells treated with different concentrations of Cis for 48 h, measured by FerroOrange probe; C, D:  $Fe^{2+}$  levels in HOS and HOS/DDP cells treated with different concentrations of Cis, Fer1 and Era for 48 h, measured by FerroOrange probe; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ##  $P < 0.01$  vs Cis group.

*AIFM2* 在 HOS/DDP 细胞中的表达水平升高 ( $t = 3.812, 4.538, 4.825, 5.204, P < 0.05$ ), 而铁死亡促进基因 *ACSL4, PTGS2* 的表达水平下降 ( $t = 6.751, 3.915, P < 0.05$ )。4 mg/L Cis 处理 48 h 后, HOS 细胞中铁死亡抑制基因 *GPX4, SLC7A11* 和 *AIFM2* 表达量下降 ( $t = 4.043, 5.010, 4.130, P < 0.05$ ), 铁死亡促进基因 *ACSL4, PTGS2* 表达量上升 ( $t = 4.251,$

$6.950, P < 0.05$ ); 而 HOS/DDP 细胞经 Cis 处理后, 铁死亡相关基因变化则不显著 (均  $P > 0.05$ ), 提示在 HOS/DDP 细胞中可能存在铁死亡相关信号通路的抑制。

**2.6 铁死亡影响 HOS 和 HOS/DDP 细胞氧化还原状态及 *GPX4* 的表达** 如图 6A、6B 所示, Cis 处理会导致 HOS 及 HOS/DDP 细胞内的 MDA 含量明

显升高, GSH/GSSG 比值明显下降 ( $F_{趋势} = 50.5$ 、 $33.92$ 、 $48.62$ 、 $31.27$ ,  $P < 0.01$ ); 但相同条件下, HOS/DDP 细胞内 MDA 含量及 GSH/GSSG 比值的变化水平要低于 HOS 细胞。在 HOS 细胞中, 与 Cis 组比较, Cis 联合 Fer1 组 MDA 含量减少而 GSH/GSSG 比值增加 ( $t = 4.601$ 、 $5.202$ ,  $P < 0.01$ ); 在 HOS/DDP 细胞中, 与 Cis 组比较, Cis 联合 Era 组 MDA 含量增加而 GSH/GSSG 比值降低 ( $t = 4.151$ 、 $4.294$ ,  $P < 0.01$ )。同时 GPX4 在维持细胞内氧化还原平衡中发挥重要作用, Western blot 结果显示, 在 HOS 细胞中, 与对照组相比, 铁死亡抑制蛋白 GPX4

蛋白的表达量随 Cis 处理浓度的增加而逐渐降低 ( $F_{趋势} = 28.35$ ,  $P < 0.01$ ), Cis 联合 Fer1 组与 Cis 组相比 GPX4 蛋白表达量升高 ( $t = 2.801$ ,  $P < 0.05$ )。见图 6C。在 HOS/DDP 细胞中, GPX4 蛋白表达量在 Cis 浓度增加到 4 mg/L 时降低 ( $t = 4.038$ ,  $P < 0.05$ ), Cis 联合 Era 组与 Cis 组相比 GPX4 蛋白表达降低 ( $t = 3.956$ ,  $P < 0.05$ )。见图 6D。

**2.7 铁死亡影响 HOS 和 HOS/DDP 细胞中 p-STAT3 和铁死亡相关蛋白的表达** Western blot 检测 Cis 处理后相关蛋白表达情况, 发现随处理浓度的增加, 在 HOS 细胞中 p-STAT3 和 SLC7A11 蛋白表达逐渐降

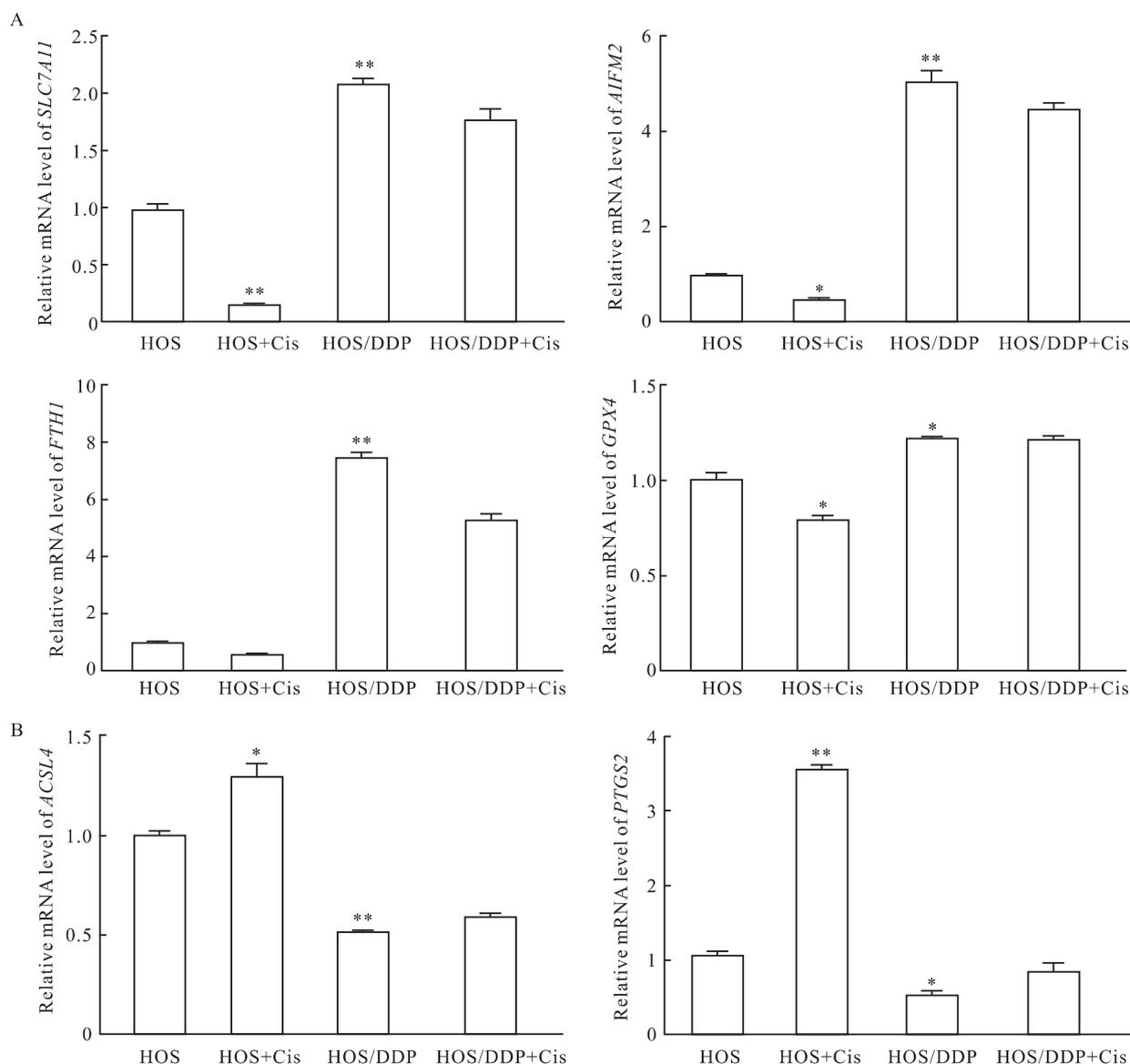


图5 Cis处理后 HOS 和 HOS/DDP 细胞铁死亡相关基因的比较

Fig.5 Comparison of ferroptosis-related genes in HOS and HOS/DDP cells after Cis treatment

The mRNA expression levels of ferroptosis-promoting (A) and inhibitory (B) genes in HOS and HOS/DDP cells treated with Cis (4 mg/L) for 48 h were analyzed by RT-qPCR; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs HOS group.

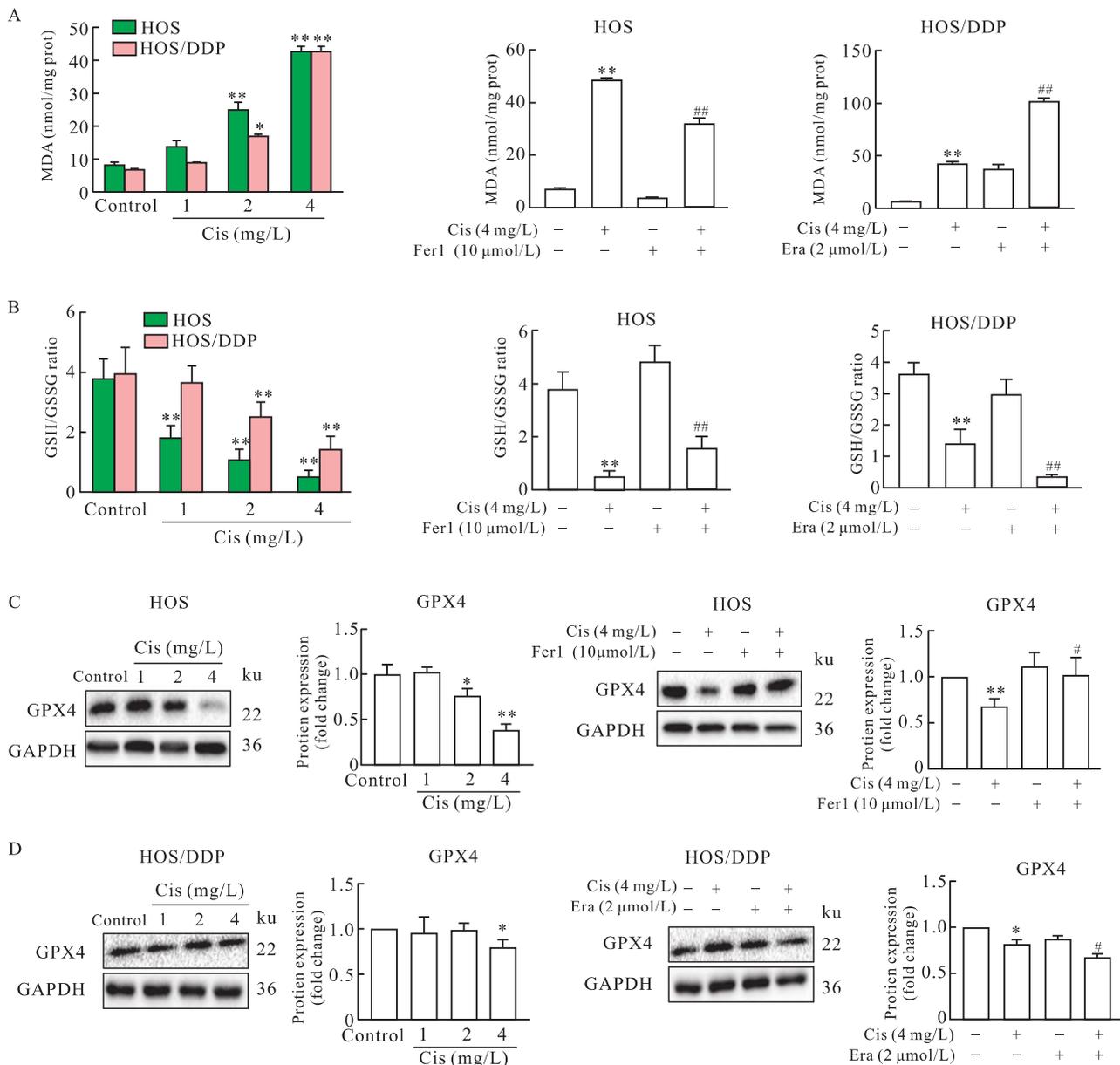


图6 各组 HOS 和 HOS/DDP 细胞 MDA 含量、GSH/GSSG 比值及铁死亡蛋白 GPX4 表达的比较

Fig. 6 Comparison of MDA content, GSH/GSSG ratio, and ferroptosis-related protein GPX4 expression among various experimental groups of HOS and HOS/DDP cells

A, B: MDA levels and GSH/GSSG ratio in HOS and HOS/DDP cells after 48 h experimental treatments; C, D: GPX4 protein expression in HOS and HOS/DDP cells detected by Western blot; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group of the same type of cells; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Cis group.

低(  $F_{趋势} = 13.400, 5.298, P < 0.05$  ); 在 HOS/DDP 细胞中 p-STAT3 蛋白表达量同样有降低(  $F_{趋势} = 4.690, P < 0.05$  ), 而 SLC7A11 变化趋势不显著。见图 7A、7B。与 Cis 组相比, 在 HOS 细胞中, Cis 联合 Fer1 组 p-STAT3 和 SLC7A11 蛋白表达量升高(  $t = 3.265, 2.926, P < 0.05$  ); 在 HOS/DDP 细胞中, Cis 联合 Era 组 p-STAT3 和 SLC7A11 蛋白表达有所降低(  $t = 2.544, 3.800, P < 0.05$  )。见图 7C、7D。

### 3 讨论

OS 是最常见的原发性骨恶性肿瘤类型。在 OS 的治疗中, Cis 常与其他药物如多柔比星和大剂量甲氨蝶呤等联用, 作为全身性化疗的常用方案<sup>[1]</sup>。尽管方案不断优化, 但 OS 整体化疗有效率仍较低, Cis 耐药性是导致化疗失败的主要原因之一。Cis 耐药可能与多种机制相关, 除药物转运蛋白的过表达、

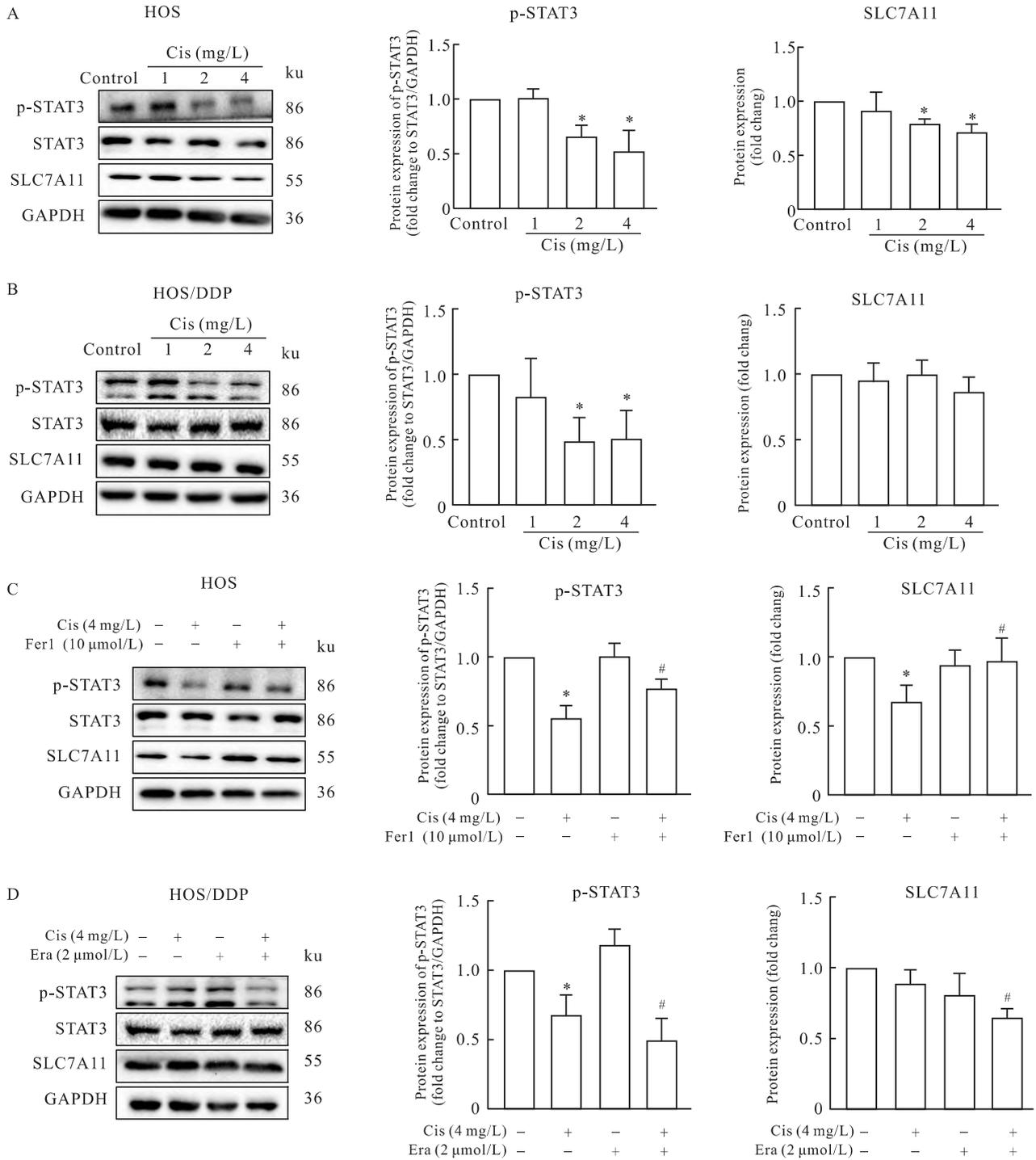


图7 各组 HOS 和 HOS/DDP 细胞中 p-STAT3 和铁死亡相关蛋白表达的比较

Fig. 7 Comparison of p-STAT3 and ferroptosis-associated protein expression among various experimental groups of HOS and HOS/DDP cells

A, B: HOS and HOS/DDP cells treated with varying concentrations of Cis for 48 h; C, D: The protein expression of p-STAT3 and SLC7A11 in HOS and HOS/DDP cells detected by Western blot; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs Cis group.

DNA 修复机制的激活、凋亡途径的抑制以及肿瘤微环境的改变等因素外<sup>[7]</sup>, 线粒体功能损伤介导的氧化还原失衡也发挥着重要作用。

研究<sup>[8]</sup>显示 Cis 耐药的卵巢癌细胞具有较低水

平的线粒体 ROS, 靶向线粒体动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, DRP1) 和线粒体丝裂融蛋白 2 (mitofusin 2, MFN2) 介导的线粒体动力学过程可以抵抗卵巢癌 Cis 耐药; Shi et al<sup>[9]</sup>发现靶向抑制亮

氨酸拉链 EF-hand 结构域跨膜蛋白 1 (leucine zipper/EF-hand containing transmembrane protein 1, LETM1) 可以通过重塑线粒体结构和功能抑制 OS 细胞的增殖和转移。在本研究中, HOS/DDP 细胞相较于 HOS 细胞, 在相同浓度 Cis 处理条件下, 细胞的活力、增殖及迁移能力下降程度减轻, 且细胞内 ROS 水平、线粒体功能及 GSH/GSSG 比值降低也明显变缓, 说明靶向线粒体相关的抗氧化过程可能是逆转 Cis 耐药的有效手段。

铁死亡以 GSH 耗竭、 $\text{Fe}^{2+}$  的积累和脂质过氧化导致的线粒体外膜损伤为关键特征, 在卵巢癌、肺癌等的 Cis 耐药过程中发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。Wen et al<sup>[11]</sup> 研究发现黄芩苷可以通过 Nrf2/SLC7A11/GPX4 轴调控铁死亡发挥抗 OS 活性。熊果酸则可以诱导细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  超载和脂质过氧化诱导 OS 细胞铁死亡<sup>[12]</sup>。本研究结果显示, HOS/DDP 细胞中铁死亡抑制基因 (*FTH1*、*GPX4*、*AIFM2* 和 *SLC7A11*) 较 HOS 细胞表达上调, 而铁死亡促进基因 (*ACSL4*、*PTGS2*) 下降; 在 Cis (1 mg/L) 处理条件下, HOS 中的  $\text{Fe}^{2+}$  水平明显升高, 而在 HOS/DDP 中差异无统计学意义。使用 Fer1 联合处理后, HOS 细胞的 ROS 和 MDA 水平、线粒体功能、GSH 及  $\text{Fe}^{2+}$  含量得到有效逆转; 使用 Era 联合处理 HOS/DDP 后则反之, 提示靶向激活铁死亡信号能够有效逆转 OS 的 Cis 耐药。

STAT3 作为肿瘤细胞内重要的信号转导及转录激活因子, 在其增殖及转移等过程中发挥促进作用。在乳腺癌中抑制 STAT3 活性可以上调 *ACSL4* 表达, 激活细胞铁死亡, 在胃癌细胞中 STAT3 则可以通过结合 *SLC7A11*、*GPX4* 及 *FTH1* 基因的启动子区域调控铁死亡信号<sup>[13-14]</sup>, 而 STAT3 在 OS 的 Cis 耐药过程中的功能有待进一步探索。本研究结果显示, 在 HOS 细胞中, 随着 Cis 处理浓度的增加, p-STAT3、GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达逐渐下降, 而联合 Fer1 处理能够逆转此下降趋势。在 HOS/DDP 细胞中, Cis 处理则引起 p-STAT3 及 GPX4 表达水平下降, 但程度不及 HOS 细胞, 而 SLC7A11 改变差异无统计学意义, 这也与耐药细胞铁死亡抑制状态相一致; 联合 Era 处理后, HOS/DDP 细胞中 p-STAT3、GPX4 及 SLC7A11 水平则显著下降。

本研究结果表明, 抑制铁死亡与 HOS/DDP 对 Cis 的耐药性存在关联。Era 提高 HOS/DDP 细胞对 Cis 的敏感性, 降低 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达, p-STAT3 表达也显著降低, 细胞内 ROS 和 MDA 水

平升高、GSH/GSSG 比值降低及  $\text{Fe}^{2+}$  积累。而在相同条件下, 应用 Fer1 处理 HOS 细胞则得到相反的结果。这提示抑制 p-STAT3 可能通过促进铁死亡提高 HOS/DDP 细胞对 Cis 的敏感性。然而铁死亡信号调控因素众多, STAT3 可能只是其中一个关键因素, 且对 HOS/DDP 细胞中 STAT3 信号的激活原因, 本研究尚未涉及。需要进一步围绕 STAT3 的激活以及上下游调控网络的改变, 在体内外水平更加深入地探讨 OS 的 Cis 耐药过程中铁死亡被抑制的分子机制, 揭示铁代谢稳态、线粒体功能以及脂质氧化之间的交互作用机制, 为 OS 的综合诊疗奠定理论基础并提供潜在靶点。

### 参考文献

- [1] Bielack S S, Blattmann C, Borkhardt A, et al. Osteosarcoma and causes of death: a report of 1520 deceased patients from the cooperative osteosarcoma study group (COSS) [J]. *Eur J Cancer*, 2022, 176: 50-7. doi: 10.1016/j.ejca.2022.09.007.
- [2] Ferretti V A, León I E. Long non-coding RNAs in cisplatin resistance in osteosarcoma [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2021, 22 (5): 41. doi: 10.1007/s11864-021-00839-y.
- [3] Fu D, Wang C, Yu L, et al. Induction of ferroptosis by ATF3 elevation alleviates cisplatin resistance in gastric cancer by restraining Nrf2/Keap1/xCT signaling [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26 (1): 26. doi: 10.1186/s11658-021-00271-y.
- [4] Zhang C, Liu X, Jin S, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 47. doi: 10.1186/s12943-022-01530-y.
- [5] Dong Y, Chen J, Chen Y, et al. Targeting the STAT3 oncogenic pathway: cancer immunotherapy and drug repurposing [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115513. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115513.
- [6] Li Y, Bai X. Naringenin induces ferroptosis in osteosarcoma cells through the STAT3-MGST2 signaling pathway [J]. *J Bone Oncol*, 2025, 50: 100657. doi: 10.1016/j.jbo.2024.100657.
- [7] 赵靖, 李原华, 张喜利, 等. Cis 耐药性机制与中药逆转策略 [J]. *药学学报*, 2020, 55(9): 2043-52. doi: 10.16438/j.0513-4870.2020-0175.
- [7] Zhao J, Li Y H, Zhang X L, et al. Mechanisms of cisplatin resistance and reverse strategies with traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55(9): 2043-52. doi: 10.16438/j.0513-4870.2020-0175.
- [8] Zou G P, Yu C X, Shi S L, et al. Mitochondrial dynamics mediated by DRP1 and MFN2 contributes to cisplatin chemoresistance in human ovarian cancer SKOV3 cells [J]. *J Cancer*, 2021, 12 (24): 7358-73. doi: 10.7150/jca.61379.
- [9] Shi Y, Kang Q, Zhou H, et al. Aberrant LETM1 elevation dysregulates mitochondrial functions and energy metabolism and promotes lung metastasis in osteosarcoma [J]. *Genes Dis*, 2023, 11 (3): 100988. doi: 10.1016/j.gendis.2023.05.005.

- [10] Ozkan E, Bakar-Ates F. Ferroptosis: a trusted ally in combating drug resistance in cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29(1): 41–55. doi: 10.2174/0929867328666210810115812.
- [11] Wen R J, Dong X, Zhuang H W, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nr2/xCT/GPX4 regulatory axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154881. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154881.
- [12] Tang Z, Dong H, Li T, et al. The synergistic reducing drug resistance effect of cisplatin and ursolic acid on osteosarcoma through a multistep mechanism involving ferritinophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5192271. doi: 10.1155/2021/5192271.
- [13] Li Y J, Fahrman J F, Aftabizadeh M, et al. Fatty acid oxidation protects cancer cells from apoptosis by increasing mitochondrial membrane lipids [J]. *Cell Rep*, 2022, 39(9): 110870. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110870.
- [14] Ouyang S, Li H, Lou L, et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102317. doi: 10.1016/j.redox.2022.102317.

## The role of STAT3 phosphorylation in regulating ferroptosis and its impact on cisplatin resistance in human osteosarcoma cells

Wang Xinping<sup>1,2</sup>, Wang Linkuan<sup>1,2</sup>, Hu Pengchao<sup>2</sup>, Shi Yihua<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Orthopedics, Postgraduate Union Training Base of Xiangyang No. 1 People's Hospital, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Xiangyang 441000; <sup>2</sup>Dept of Central Laboratory, <sup>3</sup>Dept of Orthopedics, Xiangyang No. 1 People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Xiangyang 441000)

**Abstract Objective** To investigate the role of STAT3 phosphorylation in ferroptosis regulation and its impact on cisplatin resistance mechanisms in human osteosarcoma cells. **Methods** Human osteosarcoma HOS cells and cisplatin-resistant HOS/DDP cells were treated with cisplatin (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg/L), the ferroptosis inducer Erastin (Era) (2  $\mu$ mol/L), and/or the ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Fer1) (10  $\mu$ mol/L). Cell viability and proliferation were assessed using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and colony formation assays, and cell migration was evaluated *via* a scratch assay. Reactive oxygen species (ROS), intracellular ferrous iron levels, mitochondrial membrane potential, mitochondrial function, malondialdehyde (MDA) levels, and the reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio were measured using commercial kits. The mRNA expression of ferroptosis-related genes was analyzed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), phosphorylated STAT3 (p-STAT3), and total STAT3 were determined by Western blot. **Results** With cisplatin treatment, HOS cells exhibited decreased cell viability, mitochondrial membrane potential, and GSH/GSSG ratio ( $P < 0.01$ ), along with elevated levels of ROS, ferrous ion, and MDA content ( $P < 0.01$ ). The protein levels of GPX4 ( $P < 0.01$ ), SLC7A11, and p-STAT3 also decreased ( $P < 0.05$ ). Coadministration with the ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1) reversed these aforementioned effects ( $P < 0.05$ ). In HOS/DDP cells, the mRNA levels of ferroptosis-suppressive genes (*GPX4*, *FTH1*, *SLC7A11*, and *AIFM2*) were significantly higher than those in HOS cells ( $P < 0.05$ ), whereas the expression of ferroptosis-promoting genes (*ACSL4* and *PTGS2*) was significantly lower ( $P < 0.05$ ). The cisplatin-induced reductions in cell viability and mitochondrial membrane potential, as well as the increases in ROS, ferrous ion, and MDA levels, were less pronounced in HOS/DDP cells than in HOS cells. The SLC7A11 protein level showed no significant change. However, combined treatment with the ferroptosis inducer Erastin (Era) resulted in significant decreases in viability, mitochondrial membrane potential, and the GSH/GSSG ratio in HOS/DDP cells ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the protein levels of p-STAT3, GPX4, and SLC7A11 were also markedly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The activation of ferroptosis mediated by p-STAT3 enhances cisplatin sensitivity in HOS/DDP cells.

**Key words** human osteosarcoma cell; ferroptosis; cisplatin; drug resistance; STAT3 protein; p-STAT3 protein

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. 81703015)

**Corresponding author** Shi Yihua, E-mail: yihua19@163.com