·论　著·

自噬降解FTH1诱导铁死亡提高结直肠癌对奥沙利铂敏感性的实验研究

张睿哲[1]，温安心[1]，许晓阳[1]，孟　晓[2]，温菲菲[1]，李扬扬[1]，吴淑华[1]

1. 滨州医学院附属医院病理科，山东 滨州 256600；
2. 聊城市人民医院病理科，山东 聊城 252002

［**摘要**］ **背景与目的：**重链铁蛋白1（ferritin heavy chain 1，FTH1）是铁稳态的重要调节器，可通过铁蛋白自噬维持铁稳态，而FTH1与自噬在肿瘤耐药中的关系及作用机制尚不明确。本实验旨在研究奥沙利铂耐药与FTH1、铁死亡及自噬的关系，探讨通过自噬影响FTH1及铁死亡进而逆转耐药的可行性。**方法：**应用生物信息学分析奥沙利铂敏感与耐药细胞的差异基因及其与铁死亡的关系，通过功能富集、预后与互作网络分析确定关键因子。体外细胞学实验筛选并培养奥沙利铂敏感及耐药细胞株。通过慢病毒转染、奥沙利铂处理、自噬调控及铁死亡挽救，观察调控自噬、FTH1对铁死亡以及细胞对奥沙利铂的敏感性和生物学行为的影响。收集2018年6月—2024年12月滨州医学院附属医院病理科与聊城市人民医院病理科存档的具有完整临床病理学资料的结直肠癌石蜡标本进行验证。本研究经滨州医学院附属医院及聊城市人民医院科研伦理委员会批准（批号：KYLL-304；2026074），且患者知情同意。**结果：**生物信息学分析显示，FTH1在耐药细胞中高表达且提示患者预后不良，并与自噬密切关联。细胞实验显示，与敏感细胞HCT-116相比，耐药细胞HT-29表达高水平的FTH1，自噬水平低；应用奥沙利铂处理后，敏感细胞自噬增强，FTH1下降，铁死亡指标上升；而基础自噬水平较低的耐药细胞中此变化不明显。在耐药细胞HT-29中激活自噬可降解FTH1、诱导铁死亡，奥沙利铂敏感性显著提高，该作用可被铁死亡抑制剂逆转。慢病毒实验显示过表达FTH1降低敏感细胞对药物的反应，敲低*FTH1*则增强耐药细胞的敏感性。挽救实验证实FTH1过表达可抵消自噬激活带来的增敏效应。克隆形成与transwell实验表明，激活自噬降解FTH1可抑制耐药细胞增殖与侵袭。纳入的129例临床样本验证结果显示，耐药组自噬相关蛋白LC3呈低表达、FTH1呈高表达，且FTH1水平与肿瘤退缩率呈负相关。**结论：**低基础自噬水平与FTH1调控的高铁稳态是导致奥沙利铂耐药的重要机制。结直肠癌细胞中存在奥沙利铂-自噬-FTH1-铁离子-铁死亡-耐药的级联因果关系，该因果关系可成为逆转结直肠癌耐药的新策略。

［**关键词**］ 结直肠癌；耐药；铁死亡；自噬；FTH1；铁蛋白自噬

中图分类号：R735.3　**文献标志码：**A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.04.004

基金项目：国家自然科学基金（81772637）。

利益冲突：所有作者均声明无利益冲突。

伦理批件：KYLL-304；2026074。

知情同意：已获得。

引用本文：张睿哲, 温安心, 许晓阳, 等. 自噬降解FTH1诱导铁死亡提高结直肠癌对奥沙利铂敏感性的实验研究[J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(4): 346-362.

CC协议：CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: National Natural Science Foundation of China (81772637).

Conflicts of interest: All authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: KYLL-304, 2026074.

Informed consent: acquired.

Cite this article: ZHANG R Z, WEN A X, XU X Y, et al. Experimental study of autophagic degradation of heavy chain ferritin 1-induced ferroptosis to increase the sensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin［J］. Chin Oncol, 2026, 36(4): 346-362.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

Experimental study of autophagic degradation of heavy chain ferritin 1-induced ferroptosis to increase the sensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin

ZHANG Ruizhe[1], WEN Anxin[1], XU Xiaoyang[1], MENG Xiao[2], WEN Feifei[1], LI Yangyang[1], WU Shuhua[1]　(1. Department of Pathology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China; 2. Department of Pathology, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252002, Shandong Province, China)

Correspondence to: MENG Xiao E-mail: xiaoxiaomagic@163.com; WU Shuhua E-mail: wushuhua6108@163.com

［**Abstract**］ **Background and purpose:** Ferritin heavy chain 1 (FTH1) is a key regulator of iron homeostasis, maintaining iron

balance through ferritin autophagy. However, the relationship between FTH1 and autophagy in tumor resistance and their underlying mechanisms remain unclear. This study aimed to investigate the relationship between oxaliplatin resistance and FTH1, ferroptosis, and autophagy, exploring the feasibility of reversing drug resistance by modulating FTH1 and ferroptosis through autophagy. **Methods**: Bioinformatics analysis was applied to identify differentially expressed genes between oxaliplatin-sensitive and -resistant cells and their relationship with ferroptosis. Key factors were determined through functional enrichment, prognostic, and interaction network analyses. *In vitro* cytology experiments screened and cultured oxaliplatin-sensitive and -resistant cell lines. Effects of autophagy regulation, FTH1 on ferroptosis, and cellular oxaliplatin sensitivity and biological behavior were observed through lentiviral transfection, oxaliplatin treatment, autophagy modulation, and ferroptosis rescue. Archived paraffin-embedded specimens from colorectal cancer patients, with complete clinical and pathological data, were collected from the Department of Pathology at Binzhou Medical University Affiliated Hospital and Liaocheng People's Hospital between June 2018 and December 2024 for validation. This study was approved by the Research Ethics Committees of Binzhou Medical University Affiliated Hospital and Liaocheng People's Hospital (approval No. KYLL-304; 2026074), and informed consent was obtained from all patients. **Results**: Bioinformatics analysis revealed that FTH1 is highly expressed in drug-resistant cells, associated with poor prognosis, and closely linked to autophagy. Cell experiments demonstrated that compared to sensitive HCT-116 cells, drug-resistant HT-29 cells express elevated levels of FTH1 and reduced autophagy. Following oxaliplatin treatment, sensitive cells exhibited enhanced autophagy, decreased FTH1 expression, and increased ferroptosis markers; while these changes were less pronounced in drug-resistant cells with inherently low basal autophagy levels. Activating autophagy in drug-resistant HT-29 cells degraded FTH1, induced ferroptosis, and significantly enhanced oxaliplatin sensitivity: an effect reversible by ferroptosis inhibitors. Lentiviral experiments demonstrated that FTH1 overexpression reduced drug responsiveness in sensitive cells, while *FTH1* knockdown increased sensitivity in resistant cells. Rescue experiments confirmed that FTH1 overexpression counteracts the sensitization effect induced by autophagy activation. Clonogenic and transwell assays demonstrated that autophagy activation-mediated FTH1 degradation inhibits proliferation and invasion in drug-resistant cells. Validation using 129 clinical samples revealed that the drug-resistant group exhibited low expression of autophagy-related protein LC3 and high expression of FTH1, with FTH1 levels negatively correlated with tumor regression rate. **Conclusion**: Low basal autophagy levels and FTH1-regulated high iron homeostasis constitute key mechanisms underlying oxaliplatin resistance. A causal cascade exists in colorectal cancer cells: oxaliplatin-autophagy-FTH1-iron-ions-ferroptosis/resistance. Activating autophagy represents a novel strategy to reverse colorectal cancer resistance.

［**Key words**］Colorectal cancer; Drug resistance; Ferroptosis; Autophagy; FTH1; Ferritin autophagy

结直肠癌（colorectal cancer，CRC）是常见恶性肿瘤，死亡率居恶性肿瘤第2位[1]。手术辅以化疗仍是中晚期结直肠癌治疗的主要手段。奥沙利铂是结直肠癌的一线化疗药物，然而，肿瘤细胞的耐药严重影响疗效。影响肿瘤化疗耐药的因素众多。研究[2]显示，铁死亡与肿瘤发生、发展及耐药密切相关，肿瘤细胞通过调节铁死亡相关代谢通路来逃避化疗药物的杀伤。铁死亡是一种以铁代谢异常和脂质过氧化为特征的细胞死亡方式，其中铁稳态失衡是铁死亡的重要始动因素[3]。重链铁蛋白1（ferritin heavy chain 1，FTH1）是细胞内重要的铁离子结合蛋白，是维持铁代谢稳态的“调节器”，而铁蛋白自噬在调控铁蛋白参与铁稳态的过程中发挥重要作用[4]。因此，通过自噬调控铁蛋白，进而打破铁代谢稳态，诱导铁死亡，有可能成为抑制肿瘤、提高疗效的新思路。本实验应用生物信息学分析、细胞学实验及临床样本验证，检测自噬相关因子LC3、P62、NCOA4及其铁代谢关键因子FTH1的表达，同步检测Fe^{2+}、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、活性氧（reactive oxygen species，ROS）的含量变化，探究其相关性及其与化疗敏感性的关系，旨在为逆转结直肠癌耐药提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 数据资料

从癌细胞系百科全书（Cancer Cell Line Encyclopedia，CCLE；https://sites.broadinstitute.org/ccle）中使用DepMap portal工具（https://depmap.org/portal/data_page/tab=allData）下载蛋白组学数据集Harmonized MS CCLE Gygi，作为后续差异蛋白鉴定的输入数据。

应用KM-plot平台（https：//kmplot.com/analysis/）下载基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus，GEO）数据库中的结直肠癌数据集GSE39582，提取200748_s_at（*FHC*，*FTH1*）基因在各个样本中的表达数据，过滤了表达水平为0的样本并剔除随访时间短于5年的样本，同时剔除了单个癌种中样本个数小于10个的癌种，进而对每一个表达值进行了$\log_2^{(x+1)}$变

换，获得表达数据及对应样本的总生存期（overall survival，OS）数据。

1.1.2 细胞系

人结肠癌细胞系HCT-116、LOVO、SW620、HT-29及SW480均购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

1.1.3 试剂

自噬标志物LC3（ab48394）、FTH1（ab65080）均购自英国Abcam公司；NCOA4（DF4255）购自江苏亲科生物研究中心有限公司，P62（BA2849）、BCA蛋白定量试剂盒购自美国BOSTER公司，蛋白质印迹法（Western blot）实验试剂、细胞内自噬染色测定试剂盒［单丹磺酰尸胺（dansylcadaverine，MDC）法］、Caspase抑制剂Z-VAD-FMK及MDA检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司，细胞增殖检测试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）购自日本同仁化学研究所，奥沙利铂、FerroOrange荧光探针、氯喹（CQ）、铁死亡抑制剂（ferrostatin-1）均购自美国GlpBio公司，铁离子检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司，DMEM培养基、ROS检测试剂盒均购自江苏美仑生物有限公司，实时定量逆转录聚合酶链反应（quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction，qRT-PCR）检测试剂盒购自宝日医生物技术（北京）有限公司，特异性引物序列由宝日医生物技术（北京）有限公司合成。

1.1.4 临床资料

收集2018年6月—2024年12月滨州医学院附属医院病理科与聊城市人民医院病理科存档的具有完整临床病理学资料的结直肠癌石蜡标本。纳入标准：① 根据世界卫生组织（World Health Organization，WHO）2019年消化系统肿瘤分类标准，经由两位资深的病理科医师采用双盲法阅片重新诊断，所有病例均符合结直肠癌的诊断标准；② 筛选符合局部进展期的结直肠癌患者；③ 术前均采用以奥沙利铂为基础的新辅助化疗方案（XELOX或FOLFOX）；④ 新辅助化疗后接受根治性手术。排除标准：① T1~T2期患者；② 非结直肠癌死亡的患者；③ 合并其他肿瘤的患者；④ 联合靶向治疗的患者。本研究经滨州医学院附属医院及聊城市人民医院科研伦理委员会批准（批号：KYLL-304；2026074）。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

1.2.1.1 细胞系差异表达基因（differentially expressed gene，DEG）鉴定与分析

DEG的鉴定使用GFOLD算法，对蛋白质组学数据集Harmonized MS CCLE Gygi进行数据处理，筛选在HCT-116和HT-29细胞系中均检测到表达且具有差异的高置信度DEG，将筛选后的DEG与铁死亡相关基因集（http://www.zhounan.org/ferrdb/current/）进行交集分析，并使用R包ggvenn绘制Venn图可视化重叠关系，获得共表达基因。

1.2.1.2 KEGG及GO数据库功能富集

使用KEGG rest API（https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html）获取了最新的KEGG Pathway的基因注释与R软件包org.Hs.eg.db 3.1.0中的基因的GO注释，以此作为背景，将基因映射到背景集合中，使用R软件包clusterProfiler 3.14.3进行富集分析，以获得基因集富集的结果。设定最小基因集为5，最大基因集为5000，采用双侧检验，P<0.05且FDR<0.1为差异有统计学意义。

1.2.1.3 关键因子与癌症预后相关性鉴定

从GEO数据库中下载了经统一标准化的结直肠癌数据集GSE39582，KM-plot平台自动计算最佳截断值，设置最小分组样本数大于25%，最大样本数分组小于75%，进行Kaplan-Meier生存分析。

1.2.1.4 关键因子互作关系预测

利用BioGRID CRISPR筛选数据库（The BioGRID Open Respository of CRISPR Screens，ORCS，https://thebiogrid.org/）对蛋白互作关系进行预测。与自噬相关基因集（https://autophagy.lu/v1/index.html）进行交集分析，并使用R包ggvenn绘制Venn图可视化重叠关系，获得共表达基因。

1.2.2 细胞学研究

1.2.2.1 细胞培养

人结直肠癌细胞系LOVO、SW480、SW620、HCT-116及HT-29接种于含5%胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）的DMEM培养基，放入37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养。细胞每隔2 d换液1次，待细胞密度长至80%~90%时用0.25%的胰蛋白酶消化传代，取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2.2 Western blot检测

收集细胞提取蛋白，采用二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒（bicinchoninic acid，BCA）法测定蛋白浓度。各组取20 μg蛋白进行凝胶电泳分离，并将其转印至聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride，PVDF）上，经10%脱脂奶粉封闭2 h。一抗LC3（1∶1 000）、P62（1∶1 000）、NCOA4（1∶1 000）、FTH1（1∶900）4 ℃温育过夜，二抗室温温育2 h，滴加电化学发光（electrochemiluminescence，ECL）液，成像系统曝光。利用Image J软件分析目标图像。

1.2.2.3 qRT-PCR检测

按照TRIzol试剂盒说明书提取细胞RNA并检测浓度。将RNA在37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s下通过反转录酶作用反转录为cDNA，再将cDNA进行PCR扩增。*FTH1*基因引物（5'-3'）正义链为CCAGAACTACCACCAGGACTC，反义链为GAAGATTCGGCCACCTCGTT；*β-actin*基因引物（5'-3'）正义链为AGCGAGCATCCCCCAAAGTT，反义链为GGGCACGAAGGCTCATCATT。反应体系：2 μL cDNA、10 μL 2×SYBR Green Super Mix、上下游引物各1 μL和6 μL ddH_2O，总体积为20 μL。反应条件：预变性95 ℃30 s，进行40个循环（95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s）。根据Ct值使用公式$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算mRNA的相对表达量，实验重复3次，结果取平均值。

1.2.2.4 慢病毒转染

构建靶向*FTH1*基因的特异性序列。实验设立4组：空白对照组（control）、空载体组（vector）、FTH1过表达组（OE-FTH1）及FTH1敲降组（sh-FTH1）。按照慢病毒转染流程进行，转导72 h后，改用含2 μg/mL嘌呤霉素的培养基持续筛选14 d，最终通过Western blot和qRT-PCR法分析评估转染效率并进行后续实验。

1.2.2.5 CCK-8实验

制备细胞悬液，设置实验组和对照组，以每孔1×10^3个细胞接种于96孔板，每组设计4个复孔。在实验组和对照组中分别注入200 μL含不同浓度奥沙利铂的培养基和不含药物的培养基，培养24 h。弃置液体后注入10 μL CCK-8染液，37 ℃下温育1 h后于酶标仪450 nm处测吸光度（*D*）值，计算细胞存活率/抑制率。

1.2.2.6 奥沙利铂干预实验

将筛选的实验细胞株分为对照组及奥沙利铂干预组，根据预实验，设敏感细胞的奥沙利铂半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC50；IC_{50}=8.75 μmol/L）为干预剂浓度，对照组中加入等量生理盐水，培养24 h，用于观察奥沙利铂对自噬及铁死亡的影响。

1.2.2.7 自噬干预实验

将筛选的实验细胞株，分为对照组和自噬激活剂雷帕霉素、自噬抑制剂（CQ）干预组。根据预实验，设诱导自噬改变的最低药物浓度（雷帕霉素为0.10 μmol/L，CQ为10.00 μmol/L）为实验组干预剂浓度，对照组中加入等量生理盐水，培养24 h，用于观察干预自噬对奥沙利铂敏感性的影响。

1.2.2.8 铁死亡及凋亡挽救实验

根据设计将实验细胞分别应用ferrostatin-1和凋亡抑制剂（Z-VAD-FMK）干预组，并设立对照组，干预组中分别加入ferrostatin-1（1.00 μmol/L）和Z-VAD-FMK（25 μmol/L），对照组中加入等量生理盐水，培养24 h，用于观察奥沙利铂及自噬激活对细胞的杀伤作用与铁死亡及凋亡的关系。

1.2.2.9 Fe^{2+}、MDA含量测定

按照试剂盒说明，使用相应试剂盒测定结直肠癌细胞中Fe^{2+}、MDA的含量。酶标仪检测各指标*D*值，并计算其在各样本内的含量。

1.2.2.10 MDC染色

应用MDC染色检测细胞系中自噬体的形成。将细胞在37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养，药物干预后吸弃培养液，用PBS洗涤细胞3次，向每孔中加入1 mL MDC染液，温箱温育30 min后吸净MDC染色液，使用Assay缓冲液洗涤3次，置于荧光显微镜下观察，高倍镜下随机选取5个视野，计数自噬激活细胞数所占百分比，取平均值。

1.2.2.11 FerroOrange荧光探针

将细胞在37 ℃、CO_2体积分数为5%的培养箱中培养，药物干预并弃去培养液后，用无血清培养基洗涤细胞3次，向每孔加入经无血清培养稀释的FerroOrange工作液（1 μmol/L），置于培养箱中温育30 min。荧光显微镜下观察各组细胞的荧光强度。

1.2.2.12 ROS荧光探针检测

细胞培养且药物干预后，吸弃培养液，用无血清培养基洗涤细胞3次，向每孔加入经无血清培养稀释的DCFH-DA工作液（10 μmol/L），于37 ℃温箱温育30 min，弃去工作液并用无血清培养基洗涤细胞3次。荧光显微镜下观察各组细胞的荧光强度。

1.2.2.13 细胞侵袭实验（transwell实验）

将transwell小室置于24孔板内，制备细胞密度为5×10^5/mL的单细胞悬液。取100 μL悬液加入小室上层，下室注入600 μL含20% FBS的完全培养基。每组设2个复孔，于37 ℃、CO_2体积分数为5%的条件下培养24 h。培养结束后，用湿润棉签轻柔去除上室表层未侵袭的细胞及基质胶，先后使用甲醇固定及吉姆萨染液染色。于显微镜下随机选取3个视野计数穿膜细胞，取平均值进行统计分析。

1.2.2.14 平板克隆实验

取对数生长期细胞制备单细胞悬液，按梯度密度（每孔100、200、500个细胞）接种于6孔板，每孔补充2 mL完全培养基。在标准培养条件下持续培养7~10 d，待形成肉眼可见的细胞集落时终止培养。经甲醇固定与吉姆萨染色后，应用Image J直接计数细胞克隆数。

1.2.3 病理学检查验证

1.2.3.1 免疫组织化学检测

所有石蜡标本置入10%的缓冲中性福尔马林中固定、石蜡包埋。采用免疫组织化学EnVision法：3 μm组织连续切片，脱蜡至水，高压抗原热修复，3%H_2O_2去除内源性过氧化物酶，加入一抗LC3（1∶100）、P62（1∶100）、NCOA4（1∶100）、FTH1（1∶200）置于4 ℃过夜。二抗于37 ℃温育30 min，DAB显色后苏木精复染，1%盐酸乙醇分化，脱水透明后使用中性树胶封固。使用磷酸缓冲盐溶液（phosphate-buffered saline，PBS）代替一抗作为阴性对照。

1.2.3.2 免疫组织化学检测结果判读标准

LC3主要表达于细胞膜或细胞质中，P62主要表达于细胞核或细胞质中，NCOA4、FTH1主要表达于细胞质。采用Image J软件对其进行量化判读，检测10个高倍视野内阳性细胞的积分光密度（integral optical density，IOD）值，计算平均IOD值。将数值大于平均值者判为阳性，低于或等于平均值者为阴性。依据阳性表达例数计算阳性表达率。

1.2.3.3 肿瘤退缩分级标准与分组

参照新辅助化疗术后肿瘤退缩分级（tumor regression grade，TRG）评分标准[5]，本实验病例均采用Dowrak/Rödel五级标准进行分级。Dowrak/Rödel五级标准具体分级如下：TRG0代表无反应，TRG1代表<25%肿瘤区域纤维化，TRG2代表25%~50%肿瘤区域纤维化，TRG3代表>50%肿瘤区域纤维化，TRG4代表完全缓解。

1.3 统计学处理

采用IBM SPSS 27.0软件进行统计学分析；运用GraphPad Prism 10.1.2及Image J进行图像和数据处理，计量资料采用$\bar{x} \pm s$表示，数据若符合正态分布且方差齐，则组间比较采用配对t检验或独立样本t检验；计数资料采用n（%）表示，组间比较采用χ^2检验。采用线性回归方程分析各因子表达与肿瘤退缩率的相关性。采用双侧检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 实验细胞株筛选及生物信息学分析

2.1.1 筛选细胞株及奥沙利铂细胞毒性实验

CCK-8实验结果显示，HCT-116、LOVO、SW620、HT-29的IC_{50}）值为8.75、10.43、18.02、50.38和61.41 μg/mL（图1A）。本研究将IC_{50}值较低的HCT-116细胞株作为敏感细胞、IC_{50}值较高的HT-29细胞株作为耐药细胞进行后续研究。

2.1.2 生物信息学分析HCT-116细胞系与HT-29细胞系差异基因并分析其与铁死亡、预后及自噬的关系

从CCLE中使用DepMap portal工具下载蛋白质组学数据集Harmonized MS CCLE Gygi，筛选HCT-116细胞与HT-29细胞的差异蛋白，得出4 122个DEG，将差异蛋白基因与铁死亡相关基因进行交集，获得292个共交基因（图1B）。利用KEGG数据库，对292个共交基因进行通路富集，显示其富集在铁死亡、自噬、癌症发生、细胞衰老、矿物质吸收等通路，其中*TP53*、*GPX4*、*FTH1*等15个基因高度富集在铁死亡通路上（图1C）。我们利用GO数据库对该15个基因进行功能富集，结果显示，*FTH1*高度富集在铁离子转运及稳态、自噬体等途径（图1D），且蛋白质组学数据集显示FTH1在耐药细胞HT-29中高表达，在敏感细胞HCT-116中低表达。使用R软件包进行Kaplan-Meier生存分析结果显示，*FTH1*在结直肠癌患者中提示显著的预后差异（$P<0.05$，图1E）。因此，本研究选择*FTH1*作为研究目标基因。应用GO数据库进行功能富集分析，结果显示*FTH1*与自噬高度相关。为探究自噬对FTH1的影响，应用在线数据库对FTH1进行蛋白互作网络分析（图1F），获得与*FTH1*存在互作关系的184个基因，进一步将其与自噬相关基因进行交集，获得*LC3*、*P62*、*NCOA4*在内的10个共交基因，即可能通过自噬影响FTH1（图1G）。据

此，我们推测结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性与自噬影响FTH1引发的铁死亡有关，奥沙利铂-LC3-FTH1-铁离子-铁死亡-耐药之间存在级联因果关系。

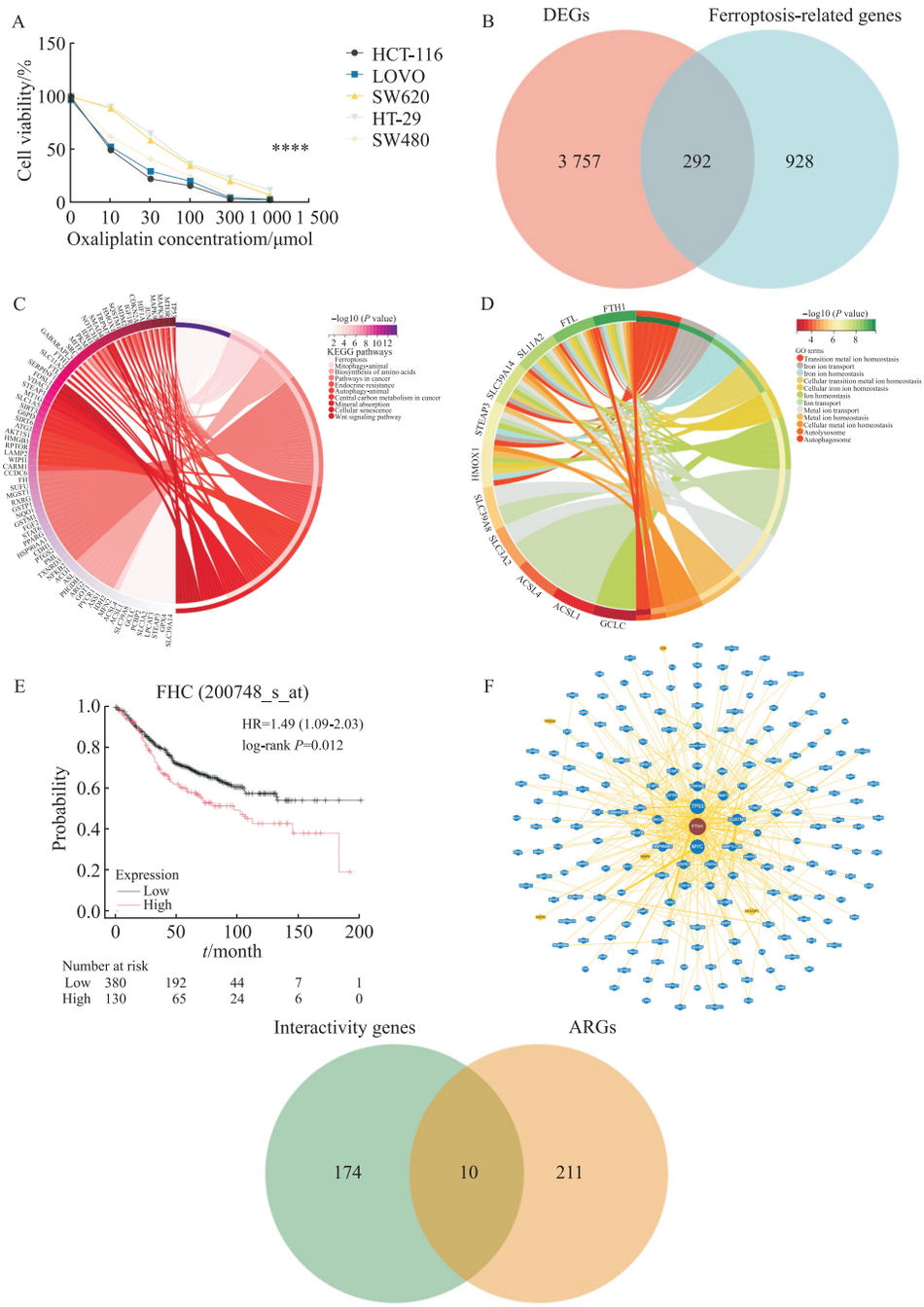

图1　结直肠癌细胞系奥沙利铂敏感性与生物信息学分析

Fig. 1　Oxaliplatin sensitivity in colorectal cancer cell lines and corresponding bioinformatic analysis

A: Dose-response curves of different colorectal cancer cell lines to oxaliplatin treatment. B: Venn diagram illustrating the overlap between differentially expressed genes and ferroptosis-related genes. C: KEGG pathway enrichment analysis of the overlapping genes. D: GO functional enrichment analysis of the highly ferroptosis-associated genes. E: Kaplan-Meier survival curve showing the prognostic value of FTH1 expression in colorectal cancer. F: Topological representation of the FTH1 protein-protein interaction (PPI) network. G: Venn diagram showing the intersection between the PPI network genes and autophagy-related genes.

2.2　结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性实验

2.2.1　HCT-116及HT-29细胞中LC3、P62、FTH1及铁死亡相关因子的基础表达情况

Western bolt检测结果显示：HCT-116细胞中LC3的表达高于HT-29细胞，而P62及FTH1的表达均低于HT-29细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$）；两株细胞的NCOA4表达无显著差异（$P>0.05$，图2A、B）。此外，HT-29细胞中Fe^{2+}的含量高于HCT-116细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$，图2C），而MDA含量的差异无统计学意

义（$P>0.05$，图2D）。

应用FerroOrange荧光探针检测细胞内Fe^{2+}含量，结果显示，HT-29细胞中Fe^{2+}荧光强度明显高于HCT-116细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$，图2E）。采用ROS荧光探针检测细胞中ROS含量，结果显示，两株细胞中的ROS荧光强度比较差异无统计学意义（$P>0.05$，图2F）。结果提示结直肠癌敏感与耐药细胞中自噬及FTH1、Fe^{2+}的表达具有差异性，与生物信息学分析结果及临床样本研究结果一致。

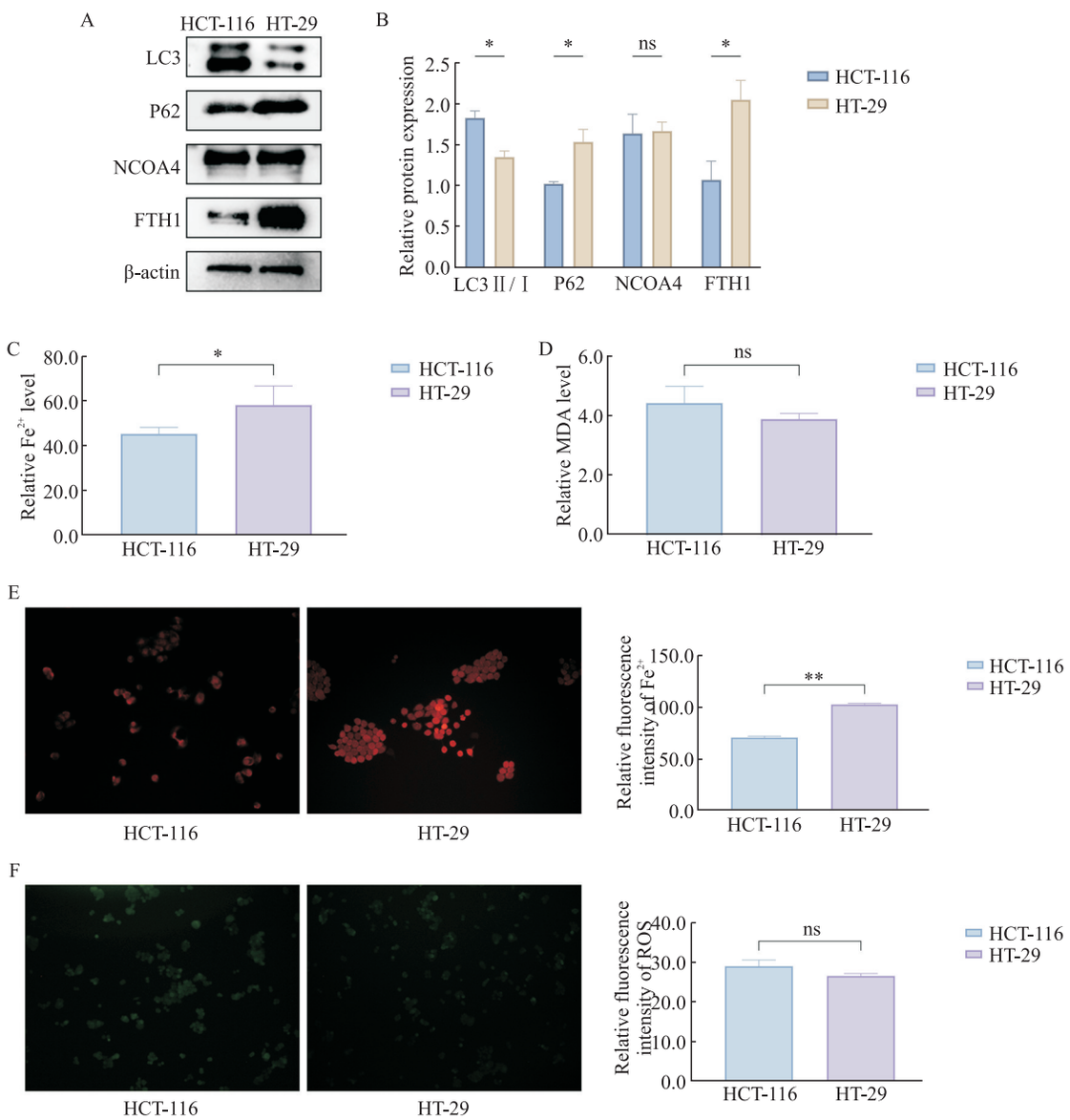

图2　HCT-116、HT-29细胞中各因子及Fe^{2+}、MDA、ROS表达

Fig. 2　Expression levels of relevant factors, Fe^{2+}, MDA, and ROS in HCT-116 and HT-29 cells

A, B: Protein expression levels of LC3, P62, NCOA4, and FTH1 in HCT-116 and HT-29 cells, as determined by Western blot analysis. C, D: The intracellular concentrations of Fe^{2+} and MDA in HCT-116 and HT-29 cells, measured using commercial assay kits. E: Representative fluorescence images of HCT-116 and HT-29 cells stained with the FerroOrange probe for intracellular Fe^{2+} (×400). F: Intracellular ROS levels detected by the DCFH-DA fluorescent probe in HCT-116 and HT-29 cells (×400). *: $P<0.05$; **: $P<0.001$; ns: $P>0.05$.

2.2.2　奥沙利铂对癌细胞的杀伤作用与自噬及铁死亡的关系

本实验对两组细胞株应用相同浓度的奥沙利铂（浓度选取预实验获得的HCT-116细胞的IC_{50}=8.75 μg/mL）处理，对照组应用等同量的生理盐水，检测各组细胞中LC3、P62、NCOA4、FTH1及铁死亡相关因子的表达水平。Western blot法检测结果显示，HCT-116经奥沙利铂作用后与对照组相比，LC3Ⅱ/Ⅰ水平显著增高，而P62、FTH1的表达均降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。HT-29细胞LC3Ⅱ/Ⅰ、P62、FTH1虽有变化，但与对照组相比，其差异均无统计学意义（$P>0.05$），两组细胞应用奥沙利铂前后，NCOA4的变化差异均无统计学意义（$P>0.05$，图3A、B）。

使用试剂盒检测奥沙利铂干预后各组细胞铁

死亡相关因子表达情况，结果显示：HCT-116细胞的Fe^{2+}含量、MDA水平明显高于对照组（$P<0.05$，图3C、D）；HT-29细胞Fe^{2+}及MDA水平虽有升高，但与对照组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$，图3C、D）。

应用FerroOrange荧光探针检测细胞内Fe^{2+}含量，结果显示，HCT-116细胞中Fe^{2+}荧光强度明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图3E）。采用ROS荧光探针检测细胞中ROS含量，结果显示，HCT-116细胞中ROS荧光强度高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图3F）；而HT-29细胞Fe^{2+}及ROS的变化虽有差异，但差异无统计学意义（$P>0.05$，图3E、F）。

应用MDC染色观察自噬活性，结果显示，奥沙利铂作用后，HCT-116细胞内荧光颗粒数量高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图3G、H）；而HT-29细胞内荧光颗粒数量与对照组相比虽有增加，但差异无统计学意义（$P>0.05$，图3G、H）。组间比较显示，HCT-116细胞内荧光颗粒显著高于HT-29细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$，图3G、H）。

CCK-8实验检测奥沙利铂对HCT-116与HT-29细胞株存活率的影响。结果显示，应用同等浓度（8.75 μg/mL）奥沙利铂干预后，HCT-116细胞与HT-29细胞的存活率均较各自对照组降低，组间比较显示，HCT-116的存活率显著低于HT-29细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$，图3I）。

奥沙利铂对肿瘤的杀伤作用与铁死亡或凋亡方面的研究结果见图3J。鉴于奥沙利铂对肿瘤的杀伤作用可被ferrostatin-1所挽救，提示奥沙利铂对肿瘤的杀伤作用与铁死亡有关。

2.2.3 自噬在奥沙利铂杀伤癌细胞及诱导铁死亡中的作用

MDC染色结果显示，与对照组相比，自噬抑制剂联合奥沙利铂作用后，HCT-116细胞中荧光颗粒显著增多，Western blot检测显示LC3Ⅱ/Ⅰ、P62及FTH1水平均增高，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4A、C），表明自噬流被阻断。HT-29经雷帕霉素及奥沙利铂作用后，细胞内荧光颗粒显著增多，Western blot检测显示LC3Ⅱ/Ⅰ水平增高，但伴随P62与FTH1表达的显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4B、D），表明形成完整的自噬流。

试剂盒检测干预自噬后各细胞系铁死亡相关因子表达情况，结果显示，与对照组比较，自噬抑制剂联合奥沙利铂作用后，HCT-116细胞中Fe^{2+}及MDA水平降低，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4E、F）。而HT-29经雷帕霉素及奥沙利铂作用后，细胞内的Fe^{2+}及MDA水平明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4G、H）。

FerroOrange荧光探针检测细胞内Fe^{2+}含量，结果显示，与对照组相比，自噬抑制剂联合奥沙利铂作用后，HCT-116细胞中Fe^{2+}荧光强度降低（$P<0.05$，图4I），而雷帕霉素联合奥沙利铂作用的HT-29细胞中Fe^{2+}荧光强度明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4J）。采用ROS荧光探针检测细胞中ROS含量，结果显示，自噬抑制剂联合奥沙利铂作用后，HCT-116细胞荧光强度低于对照组，而雷帕霉素联合奥沙利铂作用的HT-29细胞中ROS荧光强度高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4K、L）。

CCK-8实验检测结果显示，自噬抑制剂联合奥沙利铂作用后，HCT-116细胞的存活率高于单用奥沙利铂；雷帕霉素联合奥沙利铂作用后，HT-29细胞存活率低于奥沙利铂组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图4M）。组间比较显示，雷帕霉素联合奥沙利铂作用后，HT-29细胞的存活情况接近于奥沙利铂单独作用HCT-116细胞的水平（$P>0.05$，图4M）。

挽救实验结果显示，ferrostatin-1可挽救雷帕霉素干预后HT-29细胞株的死亡情况（图4N）。上述结果提示，LC3参与的自噬是奥沙利铂引发下游效应的必要环节，其可能通过影响FTH1表达，进而影响细胞内铁离子稳态，在奥沙利铂杀伤细胞及引发细胞铁死亡的过程中发挥重要作用。

2.2.4 FTH1在奥沙利铂通过自噬诱导铁死亡杀伤结直肠癌细胞中的作用

2.2.4.1 调控FTH1对结直肠癌细胞铁代谢的影响

Western blot和qRT-PCR检测结果显示，相较于control组、vector组，HCT-116与HT-29中OE-FTH1组中FTH1的蛋白及mRNA均呈高表达（$P<0.05$，图5A、B），而sh-FTH1组中FTH1的蛋白及mRNA均呈低表达，其差异有统计学意义（$P<0.05$，图5A、B）。提示转染成功。

应用FerroOrange荧光探针检测细胞内Fe^{2+}含量，HCT-116与HT-29细胞中sh-FTH1组的Fe^{2+}均高于其余各组，而OE-FTH1组的Fe^{2+}均低于其余各组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图5C）。结果提示FTH1的表达水平可影响Fe^{2+}含量。

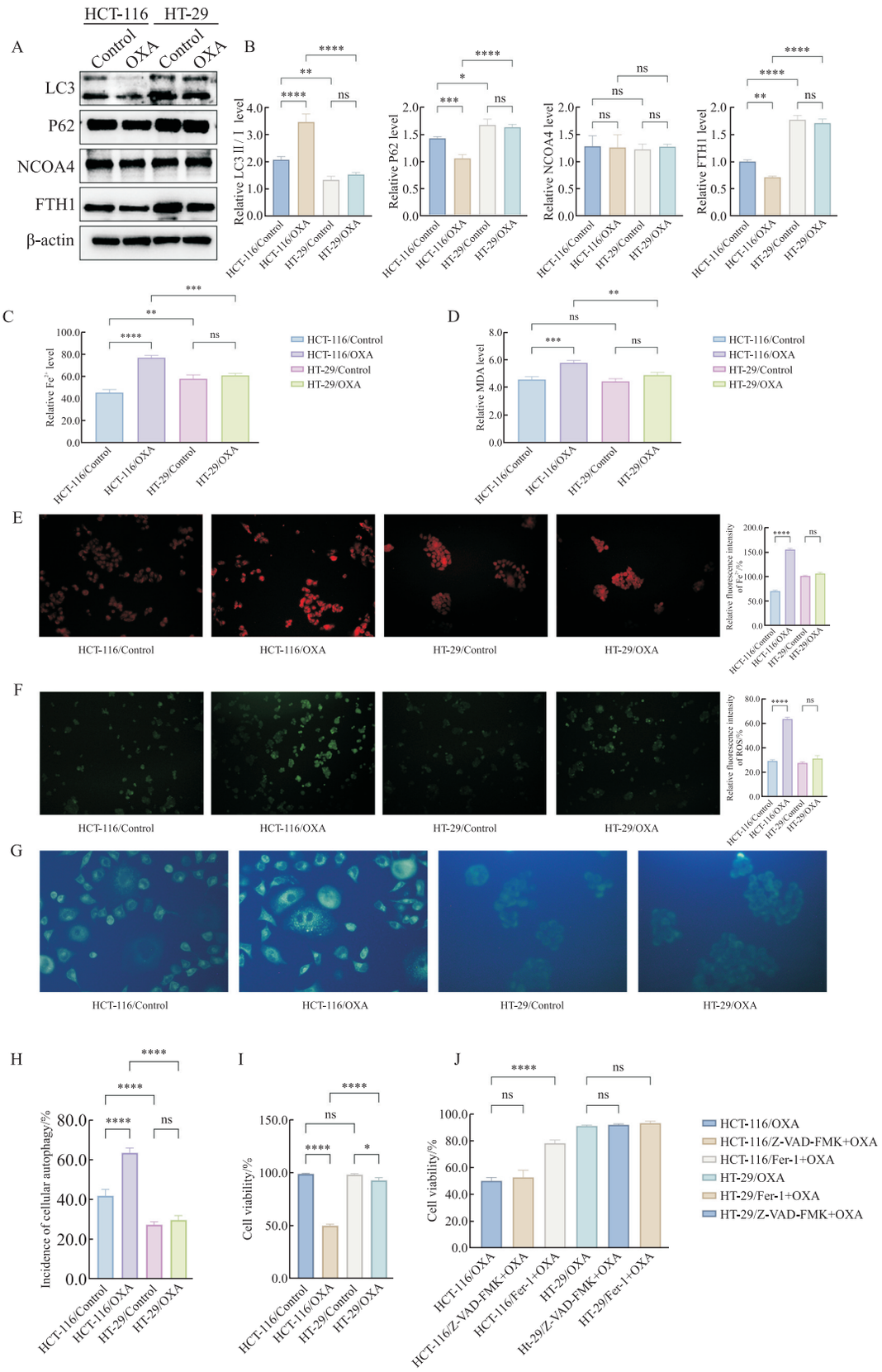

图3 奥沙利铂处理后HCT-116、HT-29细胞中各因子及Fe^{2+}、MDA、ROS表达与凋亡及铁死亡挽救

Fig. 3 Expression of relevant factors, Fe^{2+}, MDA, ROS, and the rescue effects on apoptosis and ferroptosis in HCT-116 and HT-29 cells following oxaliplatin treatment

A, B: Protein expression levels of LC3, P62, NCOA4, and FTH1 in HCT-116 and HT-29 cells after oxaliplatin treatment. C, D: Intracellular concentrations of Fe^{2+} and MDA in different treatment groups, measured using commercial assay kits. E: Representative fluorescence images of intracellular Fe^{2+} in different groups stained with the FerroOrange probe (×400). F: ROS levels in different groups detected using the DCFH-DA fluorescent probe (×400). G, H: The rate of autophagy in different intervention groups. I: Cell viability of HCT-116 and HT-29 cells after treatment with oxaliplatin (8.75 μmol/L). J: Cell viability in HCT-116 and HT-29 cells treated with oxaliplatin in combination with the apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK or the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1. *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001; ****: P<0.000 1; ns: P>0.05. Con: Control group. OXA: Oxaliplatin.

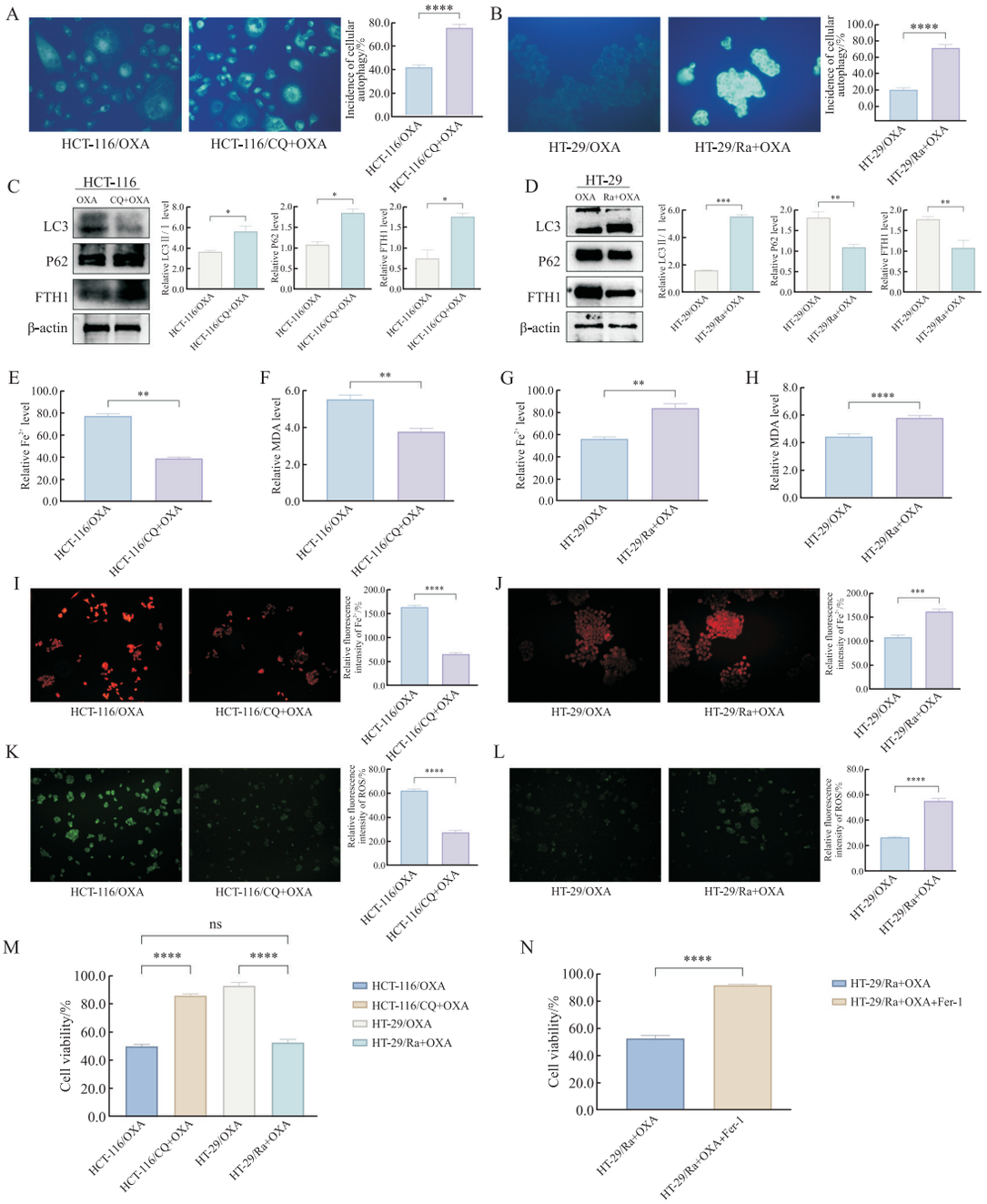

图4　雷帕霉素联合奥沙利铂处理后HCT-116、HT-29细胞中各因子及Fe^{2+}、MDA、ROS表达与铁死亡挽救

Fig. 4　Expression of relevant factors, Fe^{2+}, MDA, and ROS, and the rescue of ferroptosis in HCT-116 and HT-29 cells treated with a combination of rapamycin and oxaliplatin

A, B: Autophagy rate in HCT-116 and HT-29 cells treated with rapamycin and oxaliplatin compared to the oxaliplatin-only control group. C, D: Protein expression levels of LC3, P62, and FTH1 in HCT-116 and HT-29 cells following treatment with rapamycin and oxaliplatin. E-H: Intracellular concentrations of Fe^{2+} and MDA in the indicated cell groups, as measured by commercial assay kits. I, J: Representative fluorescence images of intracellular Fe^{2+} in HCT-116 and HT-29 cell groups, respectively, stained with the FerroOrange probe (×400). K, L: ROS levels in HCT-116 and HT-29 cell groups detected using the DCFH-DA fluorescent probe (×400). M: Cell viability across different treatment groups. N: Cell viability of HT-29 cells in the rapamycin and oxaliplatin group following co-administration of the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1. *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001; ****: P<0.000 1; ns: P>0.05. Ra: Rapamycin; OXA: Oxaliplatin.

2.2.4.2　FTH1在奥沙利铂通过自噬诱导铁死亡杀伤癌细胞中的作用

为验证FTH1在奥沙利铂诱导细胞铁死亡杀伤肿瘤细胞中的作用。我们分别将携带特定OE-FTH1序列的慢病毒转染敏感细胞HCT-116，将sh-FTH1序列的慢病毒转染耐药细胞HT-29，确定转染成功后加入同等浓度（8.75 μg/mL）的奥沙利铂处理（HT-29/sh-FTH1+OXA组和HCT-116/OE-FTH1+OXA组）。检测LC3、P62、FTH1及铁死亡相关因子的表达水平及肿瘤存活率。

Western blot结果显示，实验组与对照组LC3Ⅱ/Ⅰ与P62的表达差异无统计学意义（P>0.05，图5D），而FTH1的表达明显升高，差异有统计学意义（P<0.05，图5D）。与对照组相比，实验

组LC3Ⅱ/Ⅰ与P62表达差异无统计学意义（$P>0.05$）；但HT-29/sh-FTH1+OXA组的FTH1的表达明显低于对照组（$P<0.05$，图5E）。

试剂盒检测干预后各细胞系ferroptosis相关因子表达情况，结果显示，HCT-116细胞中，HCT-116/OE-FTH1+OXA组的Fe^{2+}及MDA水平低于对照组（$P<0.05$，图5F、G），HT-29/sh-FTH1+OXA组的Fe^{2+}及MDA水平明显高于对照组（$P<0.05$，图5H、I）。

FerroOrange荧光探针检测细胞内Fe^{2+}含量，结果显示，HCT-116/OE-FTH1+OXA组中Fe^{2+}荧光强度明显低于对照组（$P<0.05$，图5J），而HT-29细胞中，相较于对照组，HT-29/sh-FTH1+OXA组细胞中Fe^{2+}荧光强度明显升高，其差异有统计学意义（$P<0.05$，图5K）。采用ROS荧光探针检测细胞中ROS含量，结果显示，HCT-116/OE-FTH1+OXA组荧光强度低于对照组，而HT-29/sh-FTH1+OXA组细胞中ROS荧光强度高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，图5L、M）。

CCK-8实验结果显示，HCT-116/OE-FTH1+OXA组细胞存活率高于对照组细胞，而HT-29/sh-FTH1+OXA组细胞存活率低于对照组细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$，图5N）。结果提示，FTH1是影响细胞Fe^{2+}水平及铁死亡的重要因子，是奥沙利铂-LC3-FTH1-铁离子-铁死亡-耐药级联因果关系中不可或缺的重要环节。

2.2.5 救援实验验证级联因果关系及逆转耐药的可行性

为探究奥沙利铂通过自噬影响FTH1诱导铁死亡杀伤结直肠癌细胞的级联因果关系及逆转耐药的可行性，我们将耐药细胞HT-29细胞分为生理盐水组（control组）、奥沙利铂组（HT-29/OXA）、雷帕霉素+奥沙利铂联合组（HT-29/Ra+OXA）、OE-FTH1+雷帕霉素+奥沙利铂（HT-29/OE-FTH1+Ra+OXA）救援组，对各组分别处理，检测LC3、P62、FTH1、ferroptosis相关因子的表达水平及肿瘤存活率。

Western blot结果显示，HT-29/Ra+OXA组及HT-29/OE-FTH1+Ra+OXA组细胞中两组LC3Ⅱ/Ⅰ表达均高于其余两组，而P62表达低于其余两组，差异有统计学意义（$P<0.05$），FTH1的表达水平HT-29/OE-FTH1+Ra+OXA显著高于其余3组，而HT-29/Ra+OXA组则显著低于其余组，差异有统计学意义（$P<0.05$），HT-29/OXA组与HT-29/Con组FTH1表达差异无统计学意义（$P>0.05$，图6A）。

试剂盒检测结果显示，HT-29/Ra+OXA组的Fe^{2+}和MDA水平明显高于其余组（$P<0.05$，图6B、C），而HT-29/OE-FTH1+Ra+OXA组的Fe^{2+}和MDA水平明显低于HT-29/Ra+OXA组，但与HT-29 OXA组及HT-29 Con组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$，图6B、C）。

FerroOrange荧光探针与ROS荧光探针检测结果显示，HT-29/Ra+OXA组的Fe^{2+}和ROS荧光强度明显高于其余组，而HT-29/OXA+Ra+OE-FTH1组的荧光强度则低于HT-29/Ra+OXA组（$P<0.05$），与HT-29/OXA组及HT-29 Con组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$，图6D、E）。

CCK-8实验结果显示，HT-29/Ra+OXA组细胞的存活率明显低于其余组（$P<0.05$，图6F），而HT-29/OE-FTH1+Ra+OXA组细胞的存活率与HT-29 OXA组及HT-29 Con组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$，图6F）。结果提示，奥沙利铂与LC3-FTH1-铁离子-铁死亡及耐药之间存在级联因果关系，激活自噬降解FTH1增加铁离子诱导铁死亡，是逆转OXA耐药的重要途径。

2.2.6 激活耐药细胞自噬降解FTH1提高奥沙利铂对耐药细胞生物学行为的抑制作用

平板克隆实验及transwell实验结果显示，HT-29/Ra+OXA组细胞的克隆集落数及穿膜细胞数的平均值显著低于其余组，差异有统计学意义（$P<0.05$），而HT-29/OE-FTH1+Ra+OXA组细胞的克隆集落数及穿膜细胞数的平均值显著升高，且与HT-29/OXA组比较差异无统计学意义（$P>0.05$，图6G、H）。结果提示，自噬及FTH1均可影响细胞对奥沙利铂的敏感性，而激活耐药细胞自噬可降解FTH1，进而诱导铁死亡，逆转OXA耐药。

2.3 临床样本验证结直肠癌中自噬、FTH1的表达及与新辅助化疗肿瘤退缩率的相关性

2.3.1 结直肠癌中LC3、P62、NCOA4与FTH1的表达

为验证生物信息学分析及细胞学实验结果，我们应用临床样本进行验证。本研究共纳入129例患者。其中男性60例，女性69例；年龄48~76岁，中位年龄62岁；肿瘤直径≥5 cm者63例，＜5 cm者66例；组织学类型：管状腺癌102例，黏液腺癌27例；分化程度：高分化18例，中分化73例，低分化38例；浸润深度：侵犯肌层64例，侵及或浸透浆膜者65例；淋巴结转移者55例，无淋巴结转移者74例；术后进行肿瘤TRG病理

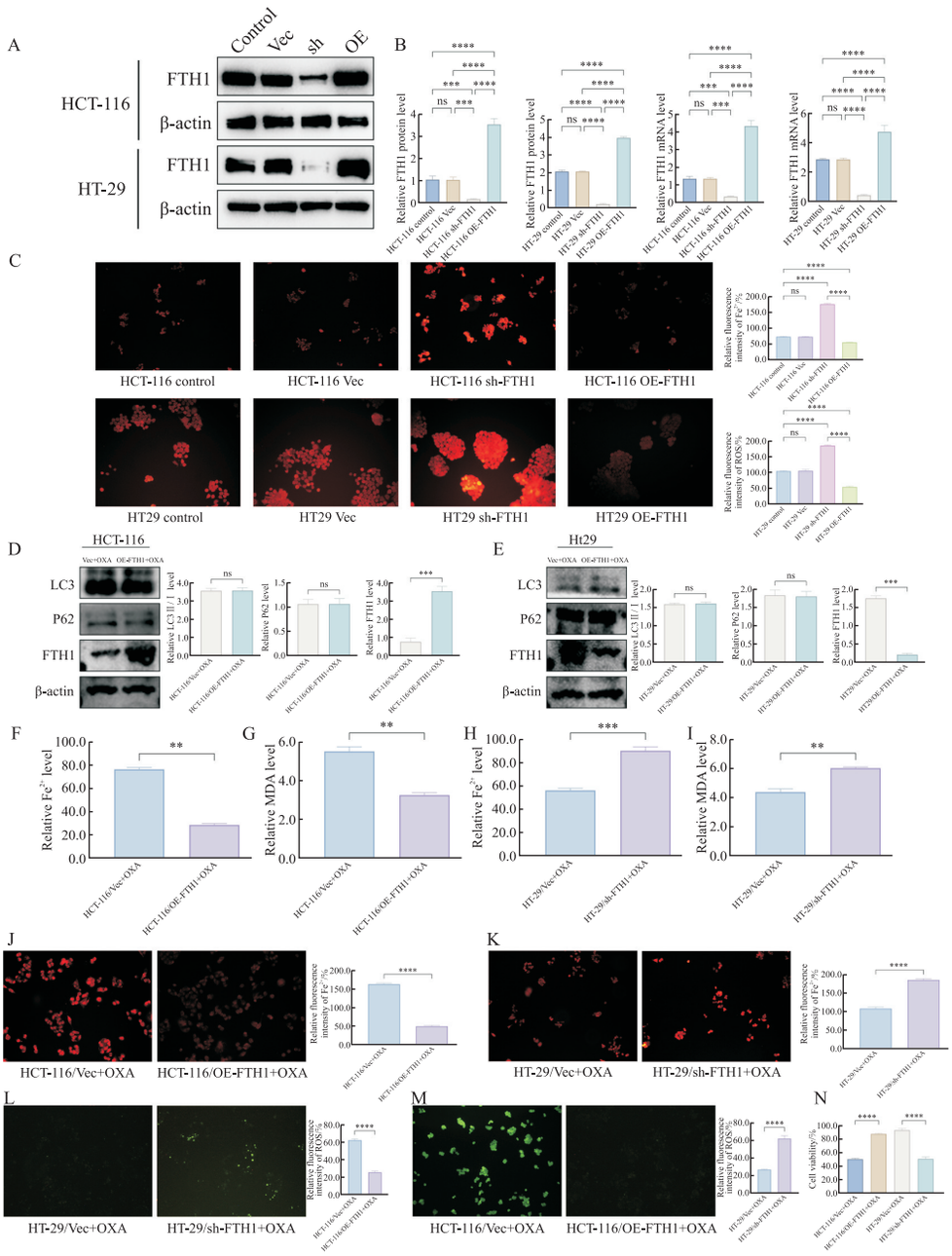

图5　干预FTH1及干预FTH1联合奥沙利铂处理后HCT-116、HT-29细胞中各因子及Fe^{2+}、MDA、ROS表达与存活率

Fig. 5　Expression of relevant factors, Fe^{2+}, MDA, ROS, and cell viability in HCT-116 and HT-29 cells following FTH1 manipulation alone or in combination with oxaliplatin treatment

A, B: Protein and mRNA expression levels of FTH1 in sensitive HCT-116 and resistant HT-29 cells after FTH1 modulation. C: Representative fluorescence images of intracellular Fe^{2+} in different cell groups after FTH1 manipulation, stained with the FerroOrange probe (×400). D: Protein expression levels of LC3, P62, and FTH1 in HCT-116 cells treated with OE-FTH1 and OXA. E: Protein expression levels of LC3, P62, and FTH1 in HT-29 cells treated with sh-FTH1 and OXA. F-I: Intracellular concentrations of Fe^{2+} and MDA in the indicated cell groups, measured using commercial assay kits. J, K: Representative fluorescence images of intracellular Fe^{2+} in HCT-116 and HT-29 cell groups, respectively, under different treatment conditions (×400). L, M: ROS levels in HCT-116 and HT-29 cell groups detected using the DCFH-DA fluorescent probe (×400). N: Cell viability across the different treatment groups. *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001; ****: P<0.000 1; ns: P>0.05.

表1　结直肠癌与正常黏膜LC3、P62、NCOA4、FTH1的D平均值

Tab. 1　Mean D values of LC3, P62, NCOA4 and FTH1 in colorectal cancer and normal mucosa

Group	LC3	P62	NCOA4	FTH1
Normal (n=129)	42.15±9.98	40.38±10.42	37.91±8.58	42.47±9.13
Tumor (n=129)	93.57±14.74*	85.62±15.12*	75.55±9.95*	83.82±11.01*

*: P<0.000 1.

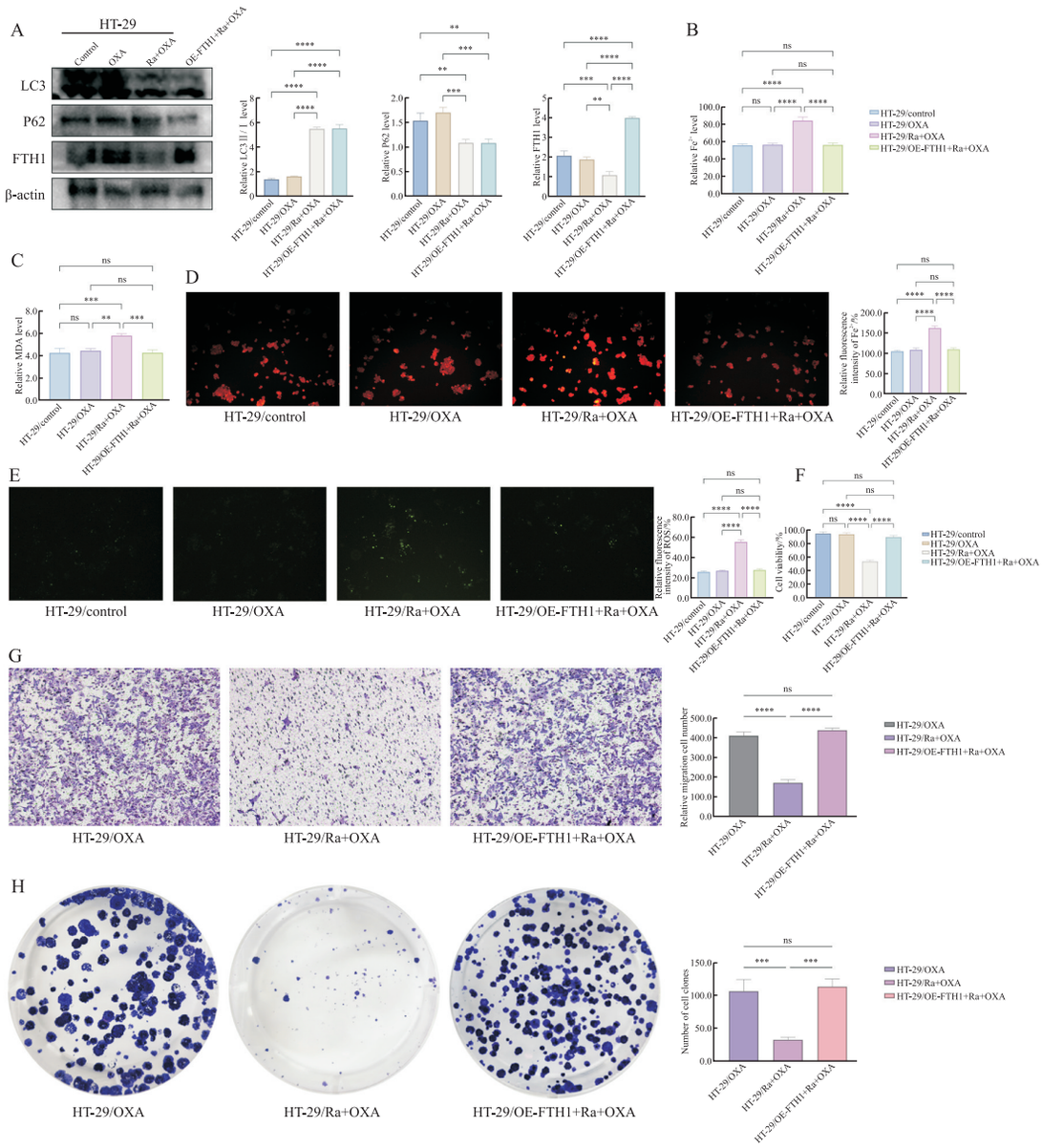

图6　救援实验及细胞生物学行为

Fig. 6　Rescue experiments and assessment of cell biological behaviors

A: Protein expression levels of LC3, P62, and FTH1 in HT-29 cells under different treatment conditions. B-C: Intracellular concentrations of Fe^{2+} and MDA in the indicated cell groups, measured using commercial assay kits. D: Representative fluorescence images of intracellular Fe^{2+} across different groups, stained with the FerroOrange probe (×400). E: ROS levels in different groups detected using the DCFH-DA fluorescent probe (×400). F: Cell viability of HT-29 cells across the different treatment groups. G: Migratory ability of HT-29 cells from different groups, as assessed by transwell migration assay (×400). H: Proliferative capacity of HT-29 cells from different groups, as determined by colony formation assay.*: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001; ****: P<0.000 1; ns: P>0.05.

学评估，其中TRG 0级11例，TRG 1级45例，TRG 2级34例，TRG 3级32例，TRG 4级7例。选取距肿瘤边缘≥5 cm正常结直肠黏膜组织作为对照。患者纳入和排除标准流程图见图7。

免疫组织化学检测结果显示：129例结直肠癌组织中，LC3、P62、NCOA4和FTH1的平均光密度均明显高于正常黏膜组织（P<0.05，表1，图8A）。根据肿瘤TRG标准将129例结直肠癌样本分为耐药组56例、敏感组73例，在同一组织连续切片中应用免疫组织化学检测LC3、P62、NCOA4与FTH1的表达。结果显示：耐药组LC3的平均光密度值及表达阳性率低于敏感组，而P62、FTH1的平均光密度值及表达阳性率则高于敏感组，差异有统计学意义（P<0.05）；耐药组中NCOA4的平均光密度值与敏感组差异无统计学意义（P>0.05，表2、3，图8B）。本实验结果显示，LC3、P62、NCOA4、FTH1在结直肠癌组织中存在异常表达，而LC3、FTH1与Fe^{2+}的表达异质性可能是导致结直肠癌化疗敏感性不同的影响因素。

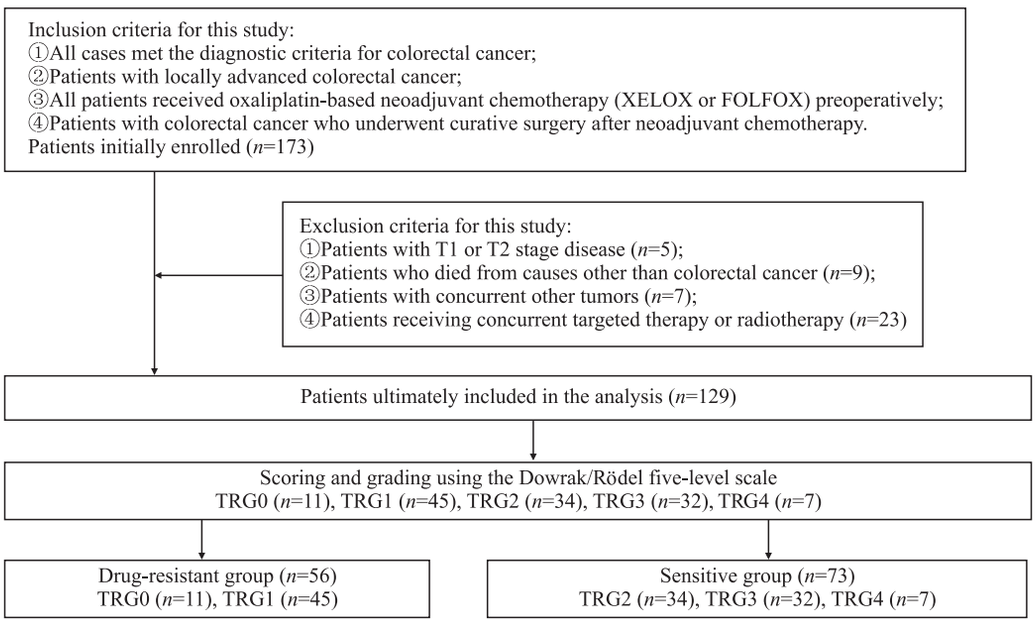

图7　患者纳入和排除标准流程图

Fig. 7　Patient inclusion and exclusion criteria flowchart

表2　结直肠癌不同亚组LC3、P62、NCOA4、FTH1的平均*D*值

Tab. 2　Mean *D* values of LC3, P62, NCOA4 and FTH1 in different subgroups of colorectal cancer

Group	LC3	P62	NCOA4	FTH1
Sensitive (*n*=73)	98.07±13.50	79.42±9.99	77.03±9.88	79.10±7.57
Resistant (*n*=56)	87.70±14.32*	94.10±16.72*	73.31±9.62	89.97±11.78*

*: $P<0.000\ 1$.

2.3.2　TRG与结直肠癌中各因子表达的相关性

根据肿瘤TRG标准，采用线性回归方程分析各因子与肿瘤退缩率的相关性。结果显示，肿瘤退缩率与LC3的表达呈正相关（$P<0.05$，图8C）；而与P62、FTH1的表达呈负相关（$P<0.05$，图8D、E）。提示LC3、P62与FTH1的改变可能是影响肿瘤药物敏感性的因素。

表3　LC3、P62、NCOA4和FTH1在结直肠癌敏感组和耐药组中的阳性表达

Tab. 3　The expression of LC3, P62, NCOA4 and FTH1 in the sensitive and resistant groups of colorectal cancer

n(%)

Group	LC3+	*P* value	P62+	*P* value	NCOA4+	*P* value	FTH1+	*P* value
Sensitive (*n*=73)	46 (63.0)	0.0011	19 (26.0)	0.0001	38 (52.1)	0.2156	21 (28.8)	0.0001
Resistant (*n*=56)	19 (33.9)		37 (66.1)		23 (41.1)		38 (67.9)	

3　讨　　论

奥沙利铂是第三代铂类化疗药物，是结直肠癌临床规范化化疗方案的一线药物[6-7]，其不仅具有铂类药物干扰DNA、诱导凋亡的作用特性，还通过诱导肿瘤细胞氧化应激以及与其他药物产生协同作用等机制抑制肿瘤细胞生长[8-9]。然而，随着肿瘤细胞的DNA修复、适应调节以及代谢调节等诸多抵御能力的增强，肿瘤对奥沙利铂的耐受性也逐渐凸显[10-11]。因此，深入探究肿瘤耐药机制对于提高奥沙利铂抗结直肠癌的疗效具有重要的临床意义。铁死亡是一种细胞死亡形式，其发生机制复杂，主要包括外源性或转运蛋白依赖性途径和内源性或酶调节途径。而铁积累和脂质过氧化是引起铁死亡的两个主要生化特征[12]。其中由铁蛋白参与的外源性铁离子代谢途径失衡所引发的铁离子过度积累是铁死亡的始动因素。随着对铁死亡认识的不断深入，铁死亡与疾病的关系，尤其是与肿瘤及治疗的关系成为研究热点[13]。我们的前期研究[14]显示，结直肠癌中存在铁离子代谢异常，并且与铁死亡、肿瘤耐药及预后密切相关。为进一步探索结直肠癌细胞奥沙利铂耐药的机制，我们首先通过药物敏感性实验筛选了对奥沙利铂敏感的HCT-116细胞株与耐药的HT-29细胞株，并通过生物信息学技术对两株

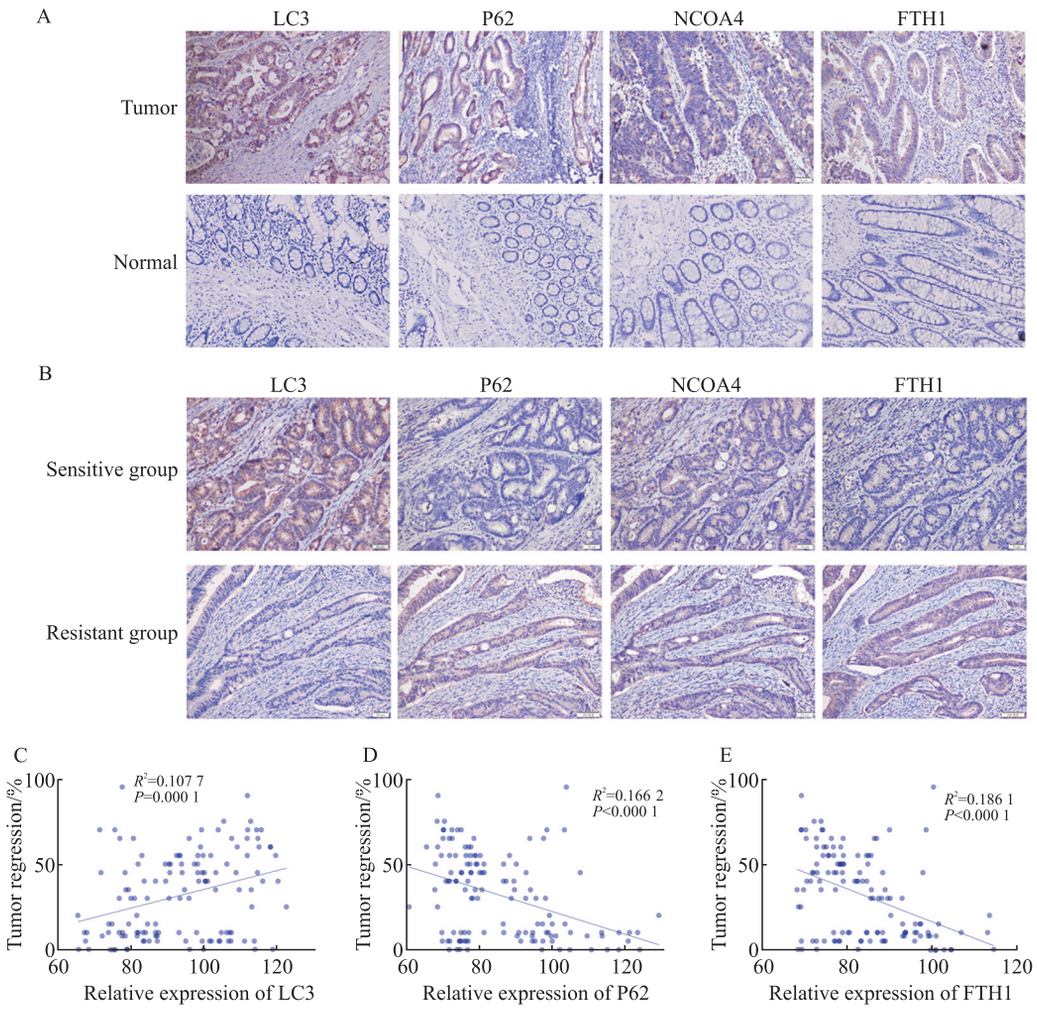

图8 临床样本验证结直肠癌新辅助化疗耐药组织及敏感组织中自噬与FTH1的表达及其与肿瘤退缩的关系

Fig. 8 Clinical samples verify the expression of autophagy and FTH1 in neoadjuvant chemotherapy-resistant and sensitive tissues of colorectal cancer and their relationship with tumor regression

A: Immunohistochemical staining was used to detect the expression of LC3, P62, NCOA4 and FTH1 in colorectal cancer tissues and adjacent normal tissues (EnVision, ×200); B: Immunohistochemical staining was used to detect the expression of LC3, P62, NCOA4 and FTH1 in neoadjuvant chemotherapy-resistant and sensitive tissues of colorectal cancer (consecutive sections of the same tissue, EnVision, ×200); C-E: Linear regression analysis was used to analyze the correlation between tumor regression rate and the expression of LC3, P62, and FTH1.

细胞的蛋白质组学数据进行分析，将获得的差异表达蛋白与铁死亡相关基因进行交集，发现作为差异和共交基因的FTH1在耐药细胞中呈高表达，其表达水平与患者不良预后显著相关。因此，我们推测FTH1的表达水平可能是影响结直肠癌细胞铁死亡及对奥沙利铂敏感性的因素之一。

FTH1可与铁蛋白轻链结合为铁蛋白，是体内铁的主要储存蛋白[15]。肿瘤细胞具有增殖活跃、高代谢、高铁需求的基本特点[16]。铁离子不仅在调节肿瘤微环境、维持基因组稳定性和控制表观遗传学方面发挥重要作用，而且高铁积累可促使肿瘤快速生长增殖[17]，但高水平铁积累会导致肿瘤细胞对铁死亡有更高的敏感性，而肿瘤细胞如何利用高铁同时又规避铁死亡风险的机制成为研究焦点，因而FTH1与肿瘤的关系被人们关注。研究发现，FTH1在多种癌症中表达异常。Ali等[18]多个团队已证实乳腺癌细胞中FTH1低表达可促进肿瘤生长。然而，Hu等[19]发现FTH1在晚期肝癌中过表达加速了癌细胞的扩增和迁移。Md Nesran等[20]研究表明下调铁蛋白FTH1的表达水平，可抑制结直肠癌细胞增殖。本研究结果显示，奥沙利铂对肿瘤的杀伤作用与FTH1表达改变及铁死亡有关，深入探索奥沙利铂影响FTH1进而激活铁死亡的机制，对于逆转肿瘤细胞耐药具有重要意义。

本研究进一步将*FTH1*的互作基因与自噬相关基因进行交集，结果显示自噬关键基因*LC3*、*P62*、*NCOA4*为共交基因。据此，我们推测结直肠癌细胞对奥沙利铂的敏感性可能与自噬影响FTH1降解引发的铁死亡有关，奥沙利铂-自噬-FTH1-铁离子-铁死亡-耐药之间可能存在级联因果关系。为此，我们以奥沙利铂影响自噬-FTH1

为切入点开展了级联因果关系的机制研究。

自噬是主要的细胞内降解系统，是指通过膜包裹部分细胞质以及细胞中需要降解的细胞器和蛋白质形成自噬体，并与溶酶体融合形成自噬溶酶体，降解内容物的过程，其中LC3是公认的自噬标志物[21]。研究[22-24]发现，自噬对铁蛋白降解至关重要。有研究[25]显示，癌细胞对包括铁蛋白自噬在内的多种途径导致的铁死亡极为敏感。而有关奥沙利铂影响自噬进而通过FTH1影响药物敏感性的研究鲜见。本研究首先通过细胞学实验检测发现敏感和耐药细胞中自噬相关因子LC3、P62和FTH1的表达存在差异。敏感细胞LC3的基础水平高于耐药组，并且在应用奥沙利铂后自噬被显著激活，与此同时FTH1表达水平伴随LC3的升高而降低，Fe^{2+}含量、MDA水平显著增高，肿瘤细胞的存活率降低。而耐药细胞LC3的基础水平低，对奥沙利铂的反应差，FTH1及铁死亡相关标志物均无显著变化。随后的临床样本验证结果与细胞学实验结果一致，LC3与FTH1表达水平存在异质性且与肿瘤退缩率及对奥沙利铂敏感性显著相关。这些结果均提示奥沙利铂对癌细胞的杀伤力不仅与细胞中FTH1的变化及铁死亡有关，同时与自噬激活有关，且在自噬基础水平高的细胞中自噬更易被过度激活。我们认为，结直肠癌中LC3、FTH1与铁离子代谢密切相关，其表达的异质性可能是结直肠癌细胞对奥沙利铂不同敏感性的影响因素。敏感细胞中LC3激活、FTH1降解、铁离子升高可能是奥沙利铂杀伤肿瘤细胞的重要条件。而改变耐药细胞的低水平自噬状态和打破铁稳态则可能成为逆转肿瘤细胞耐药的新途径。

为进一步验证自噬在奥沙利铂杀伤癌细胞及诱导铁死亡中的作用，我们分别在自噬活性高的敏感细胞中应用自噬抑制剂，而在自噬活性低的耐药细胞中应用自噬激活剂进行预处理，结果显示，敏感细胞因为自噬被抑制、FTH1表达增加，其对奥沙利铂的敏感性降低，而耐药细胞则因自噬被激活，FTH1的表达降低，引发铁死亡，导致其对奥沙利铂的耐药性被逆转。由此可见，自噬是奥沙利铂引发下游效应的必要环节，其可能通过影响FTH1表达，进而影响细胞内铁离子稳态，在奥沙利铂杀伤细胞及引发细胞铁死亡的过程中发挥重要作用。

在我们预测的级联因果关系中FTH1处于链条下游，为证明其在奥沙利铂通过自噬诱导铁死亡杀伤结直肠癌细胞中的必要性，我们首先应用慢病毒在敏感和耐药细胞中分别上调和下调了FTH1，结果显示FTH1不仅是影响细胞Fe^{2+}水平及铁死亡的重要因子，也是奥沙利铂-LC3-FTH1-铁离子-铁死亡-耐药级联因果关系中不可或缺的重要环节。之后，我们又在耐药细胞中进行了救援实验，在应用自噬激活剂的同时上调FTH1。结果显示，尽管耐药细胞自噬被激活，但由于FTH1被上调，铁死亡被抑制，故而原来可以被逆转的细胞耐药性又恢复。这进一步佐证了我们预测的级联因果关系，同时验证了通过激活自噬降解FTH1逆转奥沙利铂耐药的可行性。这一现象在平板克隆实验及transwell实验等生物学行为研究中也进一步得到证实。耐药细胞经奥沙利铂联合自噬激活剂作用后细胞的增殖及迁移能力明显降低。因此，我们认为自噬及FTH1均可影响细胞对奥沙利铂的敏感性，而激活耐药细胞自噬可降解FTH1，进而诱导铁死亡，可成为逆转奥沙利铂耐药的新策略。

有研究[23-24]报道，NCOA4是铁蛋白自噬降解过程中不可或缺的选择性自噬受体，但也有学者提出，NCOA4并非铁蛋白自噬性降解过程的唯一途径[26-27]。而本研究发现，结直肠癌中以LC3为代表的自噬与铁蛋白降解及铁死亡有着密切关系。但结直肠癌耐药组与敏感组细胞在应用奥沙利铂后，NCOA4的表达变化并无明显差异。尽管我们的实验支持了FTH1自噬降解过程非唯一性的观点，但其相关机制尚缺乏深入研究。

综上所述，结直肠癌中LC3、FTH1的表达存在异质性，可能是结直肠癌细胞对奥沙利铂不同敏感性的影响因素。奥沙利铂对肿瘤的杀伤作用与自噬降解FTH1引发的铁死亡有关。奥沙利铂-自噬-FTH1-铁离子-铁死亡-耐药之间存在级联因果关系，每一个环节均是不可或缺的重要因素。然而，本实验对上述级联因果关系仅在小样本及部分细胞中进行了初步探讨，尚存在一定局限性，需进一步增加临床样本量，并在更多细胞系以及动物实验中进一步验证，从而为利用自噬降解FTH1诱导铁死亡提高结直肠癌对奥沙利铂敏感性的治疗策略提供更可靠的依据。

第一作者：

张睿哲（ORCID: 0009-0001-2322-8302），硕士研究生。

通信作者：

孟晓（ORCID: 0009-0004-6491-612X），副主任医师，E-mail: xiaoxiaomagic@163.com；吴淑华（ORCID: 0000-

0001-5996-8057），主任医师，教授，硕士研究生导师，E-mail: wwushuhua6108@163.com。

作者贡献声明：

张睿哲：设计研究方案、实施研究过程，起草论文、修订论文；张睿哲、温安心：进行实验；许晓阳：实验分析，收集数据；孟晓：临床样本及病理资料收集；温菲菲：采集、分析数据，研究方案可行性调查分析；李扬扬：技术开发、绘制图谱；吴淑华：提出概念、基本框架、提出研究方向、设计论文框架；审核论文，论文最终版本修订。

［参 考 文 献］

［1］ BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries［J］. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

［2］ FENG F H, HE S S, LI X L, et al. Mitochondria-mediated ferroptosis in diseases therapy: from molecular mechanisms to implications［J］. Aging Dis, 2024, 15(2): 714.

［3］ JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease［J］. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4): 266-282.

［4］ WANG J W, WU N, PENG M J, et al. Ferritinophagy: research advance and clinical significance in cancers［J］. Cell Death Discov, 2023, 9: 463.

［5］ CHEN H Y, FENG L L, LI M, et al. College of American Pathologists tumor regression grading system for long-term outcome in patients with locally advanced rectal cancer［J］. Oncologist, 2021, 26(5): e780-e793.

［6］ DE CASTRIA T B, LENZ G, VALAGNI G, et al. Role of neoadjuvant therapies in locally advanced colon cancer［J］. Chin Med J, 2025, 138(17): 2091-2101.

［7］ ZHANG C Y, XU C, GAO X Y, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies［J］. Theranostics, 2022, 12(5): 2115-2132.

［8］ LIU B, WANG H. Oxaliplatin induces ferroptosis and oxidative stress in HT29 colorectal cancer cells by inhibiting the Nrf2 signaling pathway［J］. Exp Ther Med, 2022, 23(6): 394.

［9］ MARTINEZ-BERNABE T, PONS D G, OLIVER J, et al. Oxidative phosphorylation as a predictive biomarker of oxaliplatin response in colorectal cancer［J］. Biomolecules, 2024, 14(11): 1359.

［10］ XIE L S, LOCKHART C, KLIMOV D K, et al. Combining molecular dynamics and machine learning to predict drug resistance causing variants of *BRAF* in colorectal cancer［J］. Molecules, 2025, 30(17): 3556.

［11］ LI Y, BI Y, LI W J, et al. Research progress on ferroptosis in colorectal cancer［J］. Front Immunol, 2024, 15: 1462505.

［12］ 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.

［13］ TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications［J］. Cell Res, 2021, 31(2): 107-125.

［14］ WANG M M, ZHANG R Z, HE S, et al. Targeting FBXL5 to induce ferroptosis and reverse oxaliplatin resistance in iron-rich colorectal cancer［J］. Sci Rep, 2025, 15: 37189.

［15］ PLAYS M, MÜLLER S, RODRIGUEZ R. Chemistry and biology of ferritin［J］. Metallomics, 2021, 13(5): mfab021.

［16］ RODRIGUEZ R, SCHREIBER S L, CONRAD M. Persister cancer cells: iron addiction and vulnerability to ferroptosis［J］. Mol Cell, 2022, 82(4): 728-740.

［17］ CHEN Y, FAN Z M, YANG Y, et al. Iron metabolism and its contribution to cancer (review)［J］. Int J Oncol, 2019: 1143-1154.

［18］ ALI A, SHAFARIN J, ABU JABAL R, et al. Ferritin heavy chain (FTH1) exerts significant antigrowth effects in breast cancer cells by inhibiting the expression of c-MYC［J］. FEBS Open Bio, 2021, 11(11): 3101-3114.

［19］ HU W Y, ZHOU C T, JING Q G, et al. FTH promotes the proliferation and renders the HCC cells specifically resist to ferroptosis by maintaining iron homeostasis［J］. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 709.

［20］ MD NESRAN Z N, SHAFIE N H, MD TOHID S F, et al. Iron chelation properties of green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in colorectal cancer cells: analysis on tfr/fth regulations and molecular docking［J］. Evid Based Complementary Altern Med, 2020, 2020(1): 7958041.

［21］ MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues［J］. Cell, 2011, 147(4): 728-741.

［22］ ZHOU Y L, SHEN Y, CHEN C, et al. The crosstalk between autophagy and ferroptosis: what can we learn to target drug resistance in cancer?［J］. Cancer Biol Med, 2019, 16(4): 630-646.

［23］ MANCIAS J D, PONTANO VAITES L, NISSIM S, et al. Ferritinophagy via NCOA4 is required for erythropoiesis and is regulated by iron dependent HERC2-mediated proteolysis［J］. eLife, 2015, 4: e10308.

［24］ MANCIAS J D, WANG X X, GYGI S P, et al. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy［J］. Nature, 2014, 509(7498): 105-109.

［26］ ZHOU Q, MENG Y, LI D S, et al. Ferroptosis in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies［J］. Sig Transduct Target Ther, 2024, 9: 55.

［27］ GOODWIN J M, DOWDLE W E, DEJESUS R, et al. Autophagy-independent lysosomal targeting regulated by ULK1/2-FIP200 and ATG9［J］. Cell Rep, 2017, 20(10): 2341-2356.

［28］ LI J Y, FENG Y H, LI Y X, et al. Ferritinophagy: a novel insight into the double-edged sword in ferritinophagy-ferroptosis axis and human diseases［J］. Cell Prolif, 2024, 57(7): e13621.

（收稿日期：2025-11-25 修回日期：2026-02-23）

（责任编辑：王琳辉）