

二氢青蒿素通过诱导铁死亡抑制肝癌细胞生长

李艳纯¹⁾, 周 怡¹⁾, 王 鑫²⁾, 王 旭²⁾, 陈素峰³⁾, 王 莹²⁾*, 杜 璟³⁾*

(¹⁾ 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053; (²⁾ 浙江省人民医院临床医学研究所, 杭州 310014;

(³⁾ 浙江省人民医院检验中心, 杭州 310014)

摘要 二氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是青蒿素的一种衍生物,在多种肿瘤中表现出明显的抗肿瘤活性,但其具体机制不详。本文探讨了DHA对肝癌细胞的毒性作用机制。利用CCK-8试剂检测DHA对肝癌细胞株活力的影响,通过荧光探针染色及流式细胞术分析细胞内ROS及脂质过氧化物水平的变化;通过谷胱甘肽测定试剂盒检测细胞内还原型谷胱甘肽含量的变化,并通过免疫印迹分析DHA作用下细胞内铁死亡通路蛋白质中GPX4的变化。结果发现,DHA能显著抑制SMMC-7721及Huh-7细胞活力,其半数抑制浓度分别为23.74 $\mu\text{mol/L}$ 及26.92 $\mu\text{mol/L}$ 。在35 $\mu\text{mol/L}$ DHA处理下,SMMC-7721及Huh-7细胞内ROS分别升高2.6倍和2.1倍,脂质过氧化物升高2.3倍和1.7倍。DHA可诱导细胞内GSH含量下降,并能下调铁死亡相关蛋白质GPX4蛋白水平。通过利用小分子抑制剂进行功能恢复实验发现,ROS抑制剂、铁螯合剂及铁死亡抑制剂都可不同程度恢复DHA引起的细胞活力下降。进一步检测发现,铁死亡抑制剂可抑制DHA诱导的脂质过氧化,并恢复GSH含量及GPX4蛋白水平。结果表明,在肝癌细胞中,DHA可通过诱导细胞发生铁死亡抑制肝癌细胞生长。

关键词 二氢青蒿素; 肝癌; 铁死亡; 脂质过氧化物

中图分类号 R34

DHA Inhibits Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma Cells by Inducing Ferroptosis

LI Yan-Chun¹⁾, ZHOU Yi¹⁾, WANG Xing²⁾, WANG Xu²⁾, CHEN Su-Feng³⁾, WANG Ying²⁾*, DU Jing³⁾*

(¹⁾ Second Clinical Medical School of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

(²⁾ Clinical Research Institute, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College,

Hangzhou 310014, China; (³⁾ Department of Laboratory Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital,

People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China)

Abstract Dihydroartemisinin (DHA), a derivative of artemisinin, has been identified as critical and promising agent for targeting human cancers, including hepatocellular carcinoma (HCC). However, the anticancer role of DHA in HCC and its underlying mechanism are still illusive. The aim of this study was to explore the toxic mechanism of DHA to hepatocellular carcinoma cells. CCK-8 reagent was used to detect the effect of DHA on human hepatocellular carcinoma cell viability. The changes of intracellular ROS and lipid peroxide levels were analyzed by fluorescence probe staining and flow cytometry. The

收稿日期: 2019-05-07; 修回日期: 2019-09-05; 接受日期: 2019-09-20

浙江省公益技术应用研究计划(No. LGF19H080006); 浙江省医药卫生科技计划(No. 2019RC014, 2019RC115, 2017KY006, 2015KYB024); 浙江省人民医院优秀青年启动基金(No. ZRY2016B007, ZRY2016A003)和浙江省大学生科技创新活动计划(No. 2019R410053)资助

* 通讯作者 Tel: 13616718023, E-mail: dujing1@hmc.edu.cn; Tel: 18367124548, E-mail: nancywangying@163.com

Received: May 7, 2019; Revised: September 5, 2019; Accepted: September 20, 2019

Supported by Public Welfare Technology Application Research Project of Zhejiang (No. LGF19H080006); Medical and Health Science and Technology Project of Zhejiang Province (No. 2019RC014, 2019RC115, 2017KY006, 2015KYB024); Outstanding Youth Foundation of Zhejiang Provincial People's Hospital (No. ZRY2016B007, ZRY2016A003); Zhejiang Students' Science and Technology Innovation Activity Plan (No. 2019R410053)

* Corresponding author Tel: 13616718023, E-mail: dujing1@hmc.edu.cn; Tel: 18367124548, E-mail: nancywangying@163.com

glutathione assay kit was used to determine cellular reduced glutathione (GSH) content and the protein level of GPX4, a marker protein in ferroptosis, was tested by Western blot. The results showed that DHA can significantly inhibit SMMC-7721 and Huh-7 cell viabilities, with the half-inhibitory concentrations of 23.74 $\mu\text{mol/L}$ and 26.92 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Under the treatment of 35 $\mu\text{mol/L}$ DHA, the ROS in SMMC-7721 and Huh-7 cells increased by 2.6-fold and 2.1-fold, respectively, and lipid peroxides increased by 2.3-fold and 1.7-fold. DHA induced a decrease of GSH amount and GPX4 protein level. Further rescue experiments exhibited that different small molecule inhibitors, like ROS inhibitors, iron chelating agents or ferroptosis inhibitors, could restore the decreased cell viability caused by DHA to different degrees. More tests demonstrated that ferroptosis inhibitor diminished the lipid peroxidation induced by DHA and reversed the GSH content and GPX4 protein levels. These results suggest that DHA inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by inducing ferroptosis.

Key words dihydroartemisinin (DHA); hepatocellular carcinoma (HCC); ferroptosis; lipid peroxide

肝癌是世界范围内第 5 常见的恶性肿瘤,俗称癌中之王,是第 3 大致死性癌症。全世界每年约有 70 万人被诊断为肝癌^[1]。我国肝癌约占全球肝癌的 40%~50%,死亡率高达 20.37/10 万^[2]。肝癌起病隐匿,进展迅速,生存期短,严重危害人类健康。世界各地的肝癌发病率均有上升趋势,已成为一个极其严重的国际卫生问题。肝癌细胞由于其先天性高表达多药耐药基因,使其对化疗不敏感,因此肝癌的治疗方法治疗模式已从单一模式逐渐向多模式、多学科处理的综合治疗方向发展^[3,4]。其中,中医药综合治疗肝癌是目前提高肝癌疗效的一个重要途径。

青蒿素是从菊科艾属黄花蒿中提取的一种含过氧基团的倍半萜内酯,二氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是青蒿素的衍生物,除具有抗疟活性外,其在抗病毒及抗菌中也有重要作用^[5,6]。此外,二氢青蒿素的抗肿瘤作用也已成为研究重点。目前有多项研究显示,二氢青蒿素对肝癌、舌鳞癌、食管癌、胰腺癌及白血病等多种癌症细胞具有抑制作用^[7-11]。其机制研究主要集中在二氢青蒿素诱导自噬、细胞周期阻滞及凋亡,进而导致肿瘤细胞生长受限。

目前研究显示,二氢青蒿素也会导致癌细胞铁代谢异常,进而引起铁稳态失衡^[12]。作为新型细胞的死亡方式,铁死亡是一种铁依赖的脂质活性氧聚集,进而导致氧化损伤的细胞死亡方式,常伴有还原型谷胱甘肽(GSH)水平降低及谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)的下调^[13],在抗肿瘤研究中日益受到重视^[14]。肝癌细胞中,通常有自由铁的累积,本研究拟从铁死亡的角度,进一步揭示二氢青蒿素诱导肝癌细胞死亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及活性检测

肝癌细胞株 SMMC-7721 及 Huh-7 购于中国上海科学院细胞库,呈贴壁生长,在含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基 (Gibco) 中培养 (37℃, 5% CO₂)。待细胞长至 70% 汇合度时,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液 (Gibco) 消化后制成 10⁵ 细胞 / mL 密度的细胞悬液,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板。培养 24 h 时,换液并加入含不同浓度 DHA (Selleck 公司) 的培养液继续培养 24 h,弃掉培养液,PBS 洗涤 1 次,加入含 10% CCK-8 (上海碧云天生物技术有限公司) 的培养液,37℃ 孵育 30 min,检测 450 nm 处的光密度值, A_{450} 值与细胞活性成正比,定义对照组 A_{450} 值代表的细胞活力为 1,计算相对细胞活力,绘制细胞活力曲线并计算 DHA 对肝癌细胞的半数抑制率。

1.2 细胞内 ROS 水平测定

待细胞处理结束后去除培养液,胰酶消化,离心收集细胞,PBS 洗涤细胞 3 次,加入 1 mL,2 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA。活性氧 (ROS) 检测试剂盒内荧光探针 DCFH-DA 本身无荧光,但可穿透细胞膜。进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH,而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针被装载到细胞内。细胞内 ROS 将无荧光的 DCFH 氧化成有荧光的 DCF,从而对细胞内 ROS 水平进行测定。37℃ 避光孵育 20 min,PBS 洗涤细胞 3 次,用 PBS 液重悬细胞后进行流式细胞术检测分析。

1.3 细胞蛋白质的提取

待细胞处理结束后,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞并收集于 1.5 mL EP 管,4℃、600 g 离心 5 min,弃上清,冰浴 PBS 洗涤细胞 3 次。每 10 mg 新鲜细

胞用 50 μL 1% Triton X-100 裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 137 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 3 mmol/L Phenylmethanesulfonyl fluoride) 4℃ 裂解 15 min, 12 000 g 离心 15 min, 取上清即为全细胞蛋白质, BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 对细胞内蛋白质进行定量。

1.4 细胞内谷胱甘肽水平测定

根据 GSH 测定说明书 (上海碧云天生物技术有限公司) 配制好各试剂, 提取各处理组细胞内蛋白质并定量, 取 100 μg 蛋白质与 2 mL 试剂混匀, 4 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液进行显色反应 (反应体系参考说明书), 室温静置 5 min 后计算 420 nm 处的 A 值, 根据对照组细胞的 A 值计算各处理组细胞内的相对 GSH 含量并统计作图。

1.5 脂质过氧化物含量测定

待细胞处理结束后, 去除培养液, PBS 洗涤细胞 2 次, 收集细胞团, PBS 洗涤细胞 1 次, 用 500 μL 2.5 $\mu\text{mol/L}$ BODIPY 荧光探针染液重悬细胞沉淀, 37℃ 避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 最后用 PBS 液将细胞重悬后进行流式细胞术检测分析。

1.6 免疫印迹检测

收集细胞并用 PBS 洗涤细胞 2 次, 将细胞裂解后获取细胞内蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度, 用裂解液及 5x 载样缓冲液将各组蛋白质浓度调为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 95℃ 加热 5 min。取 20 μg 上样, 12% SDS-PAGE, 经电泳及转膜后, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h。根据蛋白质分子量大小将目的条带剪下, 孵于相应的一抗中, 4℃ 过夜。TBST 缓冲液洗涤条带 3 次, 常温孵育对应的二抗 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次, ECL 显影, Bio-Rad 凝胶成像仪曝光分析。

1.7 统计学方法

每组数据重复 3 次, 采用 Graphpad Prism 6.0 进行数据分析, 定量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本间均数的比较采用方差分析, 统计值 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二氢青蒿素抑制肝癌细胞生长

多数研究表明, DHA 对肿瘤细胞活力具有抑制作用。为了检测 DHA 对肝癌细胞活力的影响及确定药物作用浓度, 用不同浓度的 DHA 分别处理细胞 24 h, 采用 CCK-8 试剂对细胞活力进行检测。结果如 Fig.1 所示: 随着 DHA 浓度的升高, 细胞活力逐渐

下降。通过活力曲线, 可以计算出 DHA 在处理 24 h 时, 对肝癌细胞 SMMC-7721 及 Huh-7 的半数抑制浓度分别为 23.74 $\mu\text{mol/L}$ 及 26.92 $\mu\text{mol/L}$ 。说明 DHA 显著抑制肝癌细胞的生长。

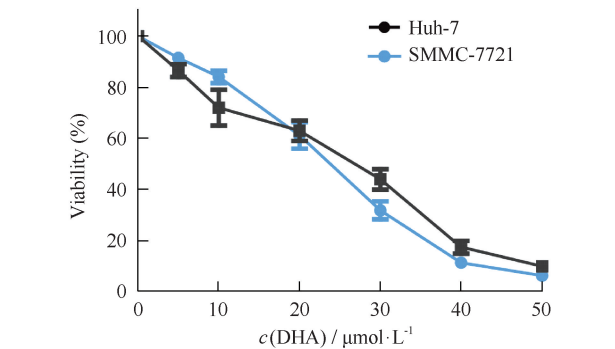


Fig. 1 Viabilities of cells were reduced by DHA treatment SMMC-7721 and Huh-7 cells were treated with different concentrations (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol/L}$) of DHA for 24 hours before being tested by CCK-8 kit, the relative cell viability of each group was calculated by the absorbance value under the condition of defining control group's viability as 1. The experiments were performed in triplicates

2.2 二氢青蒿素诱导细胞内 ROS 水平增加

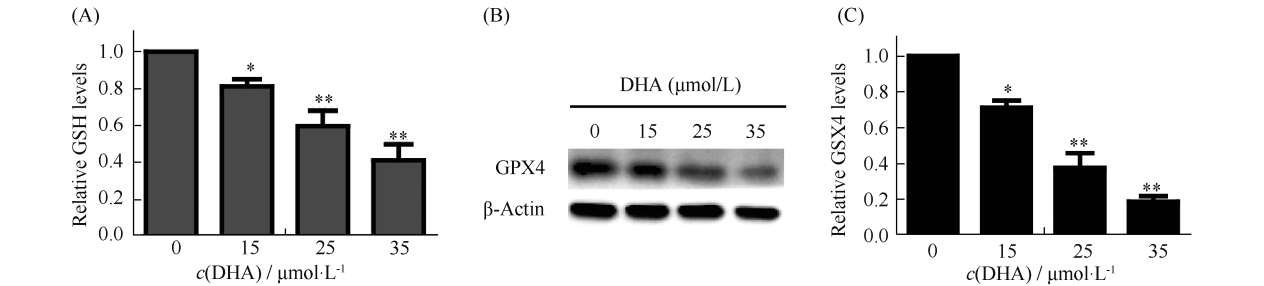
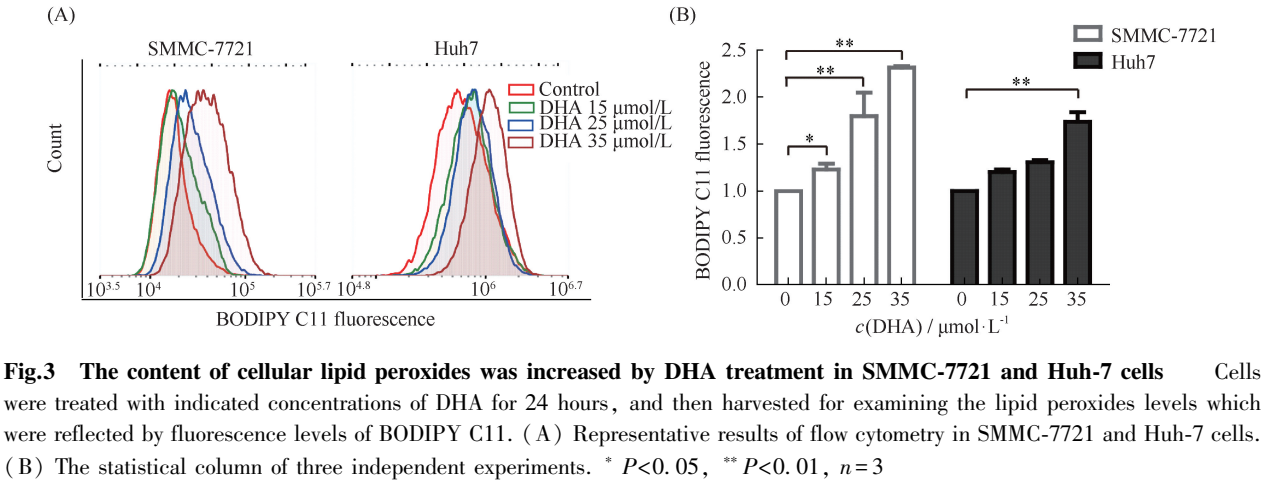
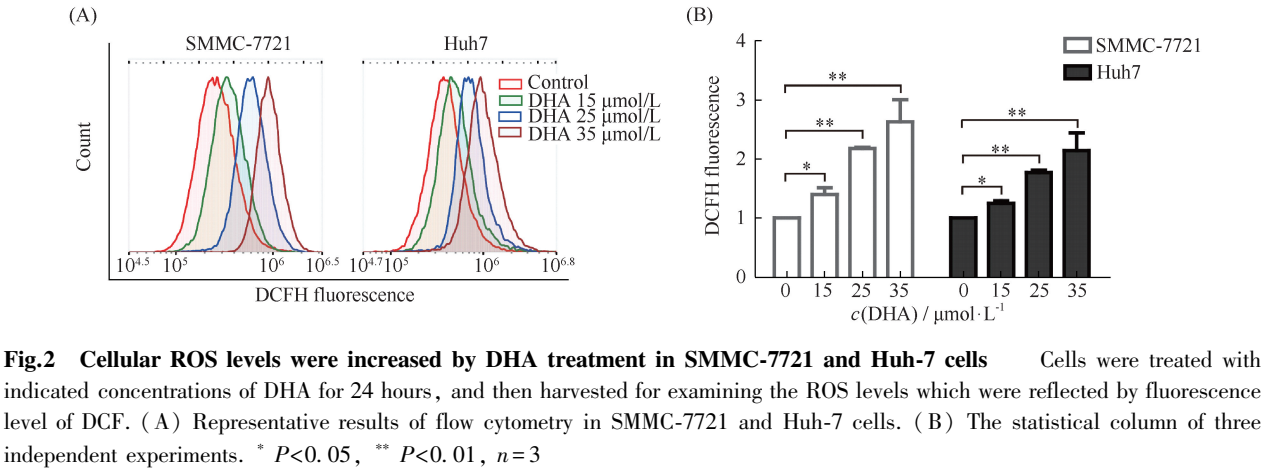
以 DHA 的半数抑制浓度为参考, 选取 3 个浓度梯度的 DHA 分别处理细胞 24 h, 利用活性氧检测试剂 DCF-DA 对细胞内 ROS 水平进行测定。流式细胞术结果如 Fig.2A 所示: 肝癌细胞内 DCF 荧光值随着药物浓度的增加而增加, 说明 DHA 可显著激活细胞内 ROS 的累积。SMMC-7721、Huh-7 两株细胞在 35 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下分别诱导 ROS 升高 2.6 倍和 2.1 倍 (Fig.2B)。

2.3 二氢青蒿素使细胞内脂质过氧化物水平增加

用上述浓度 DHA 分别处理细胞 24 h, 利用 BODIPY 荧光探针对细胞内脂质过氧化物含量进行检测。流式细胞术结果如 Fig.3A 所示: 荧光强度随着处理药物浓度的增加而显著增加, 说明 DHA 能强烈诱导细胞发生脂质过氧化反应, 并具有浓度依赖性。SMMC-7721、Huh-7 两株细胞在 35 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下分别诱导脂质过氧化物升高 2.3 倍和 1.7 倍 (Fig.3B)。

2.4 二氢青蒿素可降低细胞内还原型谷胱甘肽水平

铁死亡的发生常伴有还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平下降及谷胱甘肽过氧化酶 4 (GPX4) 的下调^[13]。为了探究 DHA 对肝癌细胞的抑制作用是否由细胞内铁死亡机制所致, 利用 GSH 检测试剂



盒对 DHA 处理的 SMMC-7721 细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)水平进行检测,结果如 Fig.4A 所示。细胞内 GSH 水平随着 DHA 处理浓度的增加而降低,35 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,GSH 下降 59%。通过免疫印迹结果显示,肝癌细胞内谷胱甘肽过氧化酶 4 (GPX4)水平随着 DHA 处理浓度的升高,也明显下降。在 35 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,GPX4 下降 81.3% (Fig.4C)。

2.5 不同小分子抑制剂对肝癌细胞活力的恢复

铁死亡是一种伴随铁累积,ROS 升高的特征性细胞死亡方式。本文分别采用铁螯合剂(deferoxamine, DFO),铁死亡抑制剂(ferrostatin-1),ROS 清除剂(N-acetylcysteine, NAC)处理细胞,观察相同 DHA 处理条件下各抑制剂分子对 DHA 引起的细胞活力下降的恢复效果。结果如 Fig.5 所示:不同抑制剂对 DHA 所致的细胞活力下降都有恢复作用,但铁螯合

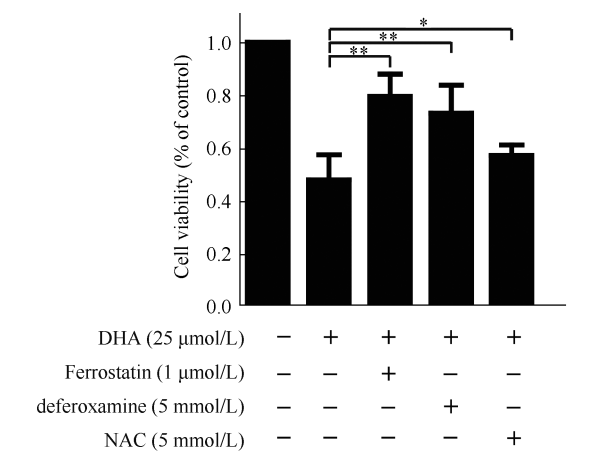


Fig.5 Effects of different inhibitors on the viability of DHA treated cells SMMC-7721 cells were treated with or without indicated concentrations of DHA, combined with/without ferrostatin-1, DFO or NAC for 24 hours, and then harvested for testing the cell viability by CCK-8 kit. All experiments were performed in triplicates. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=3$

剂及铁死亡抑制剂对细胞活力恢复作用更明显。
2.6 铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 可恢复二氢青蒿素诱导的肝癌细胞变化

基于铁死亡抑制剂对细胞活性恢复作用更明显,本文选取 Ferrostatin-1 进行恢复实验。流式结果

显示(Fig.6A, B):肝癌细胞内脂质过氧化物在 DHA 处理后上升,而加入 Ferrostatin-1 可明显恢复 DHA 诱导的脂质过氧化反应。进一步通过 GSH 检测试剂盒及免疫印迹检测细胞内 GSH 水平及 GPX4 蛋白表达情况。结果表明:铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 可将细胞内 GSH 水平恢复至 81%(Fig.6C),并上调细胞内 GPX4 蛋白表达水平(Fig.6D)。

3 讨论

寻找特异有效的癌症治疗药物一直是临床科研工作的目标。青蒿素是我国科学家 20 世纪 70 年代从植物黄花蒿的叶和花蕾中提取的一种含有过氧基团的倍半萜内脂类化合物。过氧键是青蒿素活性所必需的,其化学性质活泼,可以在体内发生 Fenton 反应生成羟自由基,从而对细胞产生强烈毒性。青蒿素主要活性产物是二氢青蒿素,屠呦呦用其治疗疟疾的疗效已获得世界认可,且青蒿素的毒副作用小,安全性好。随着近年老药新用研究的不断深入,目前研究显示,青蒿素在其他疾病中也具有一定疗效,尤其是在抗肿瘤方面具有较显著的作用,因此 DHA 的抗癌机制一直是研究的重点,但其具体机制尚不明。

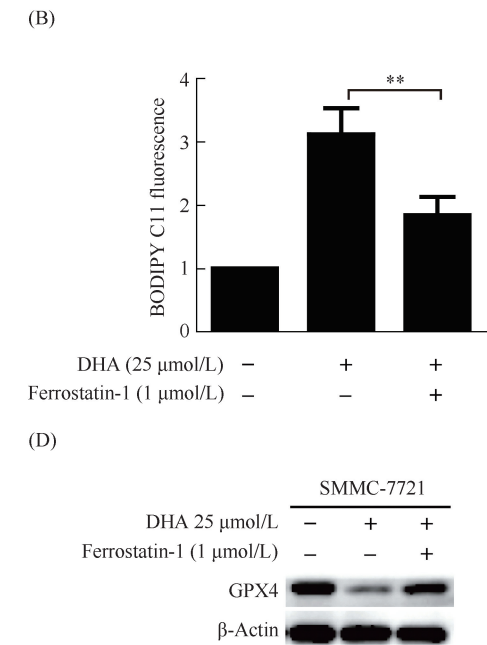
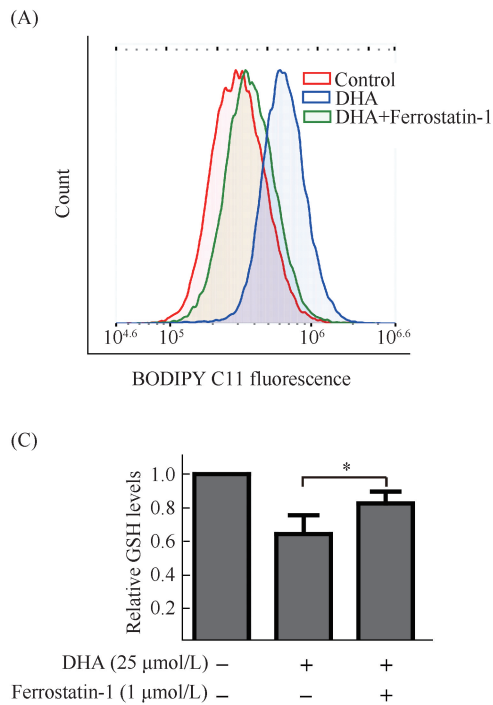


Fig.6 Ferroptosis inhibitor remedies the phenotypes of DHA treated cells SMMC-7721 cells were treated with or without indicated concentrations of DHA and ferrostatin-1 for 24 hours, and then harvested for testing. (A) Representative results of flow cytometry in SMMC-7721 cells. (B) The statistical columns of three independent flow cytometry experiments. (C) The statistical columns of three independent experiments for GSH assay. (D) The Western blot result of GPX4 expression. β -Actin was used as a loading control. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $n=3$

Zhang 等^[10]研究 DHA 对肝癌细胞的抑制机制,首次发现 DHA 可通过诱导细胞发生周期阻滞和凋亡从而抑制细胞生长。随后,也有关于 DHA 在肝癌中的机制研究,大都侧重于凋亡^[11]。在肝癌细胞中,充足的铁元素是保证肿瘤细胞快速分裂的前提条件之一。肝癌细胞高表达转铁蛋白受体 TFR,促进外铁的摄入,同时二价金属离子转运体 (divalent metal transporter 1, DMT1) 的高表达,进一步增加了细胞内自由铁 (labile iron portion, LIP) 水平^[15, 16]。因此,肿瘤细胞中异常的铁代谢水平可以作为一个极具前景的抗肿瘤切入点。近期也有研究表明, DHA 可通过调控转铁蛋白受体,促进白血病细胞铁累积,进而发生铁死亡^[17-19]。因此,本文通过检测 DHA 是否也可通过铁死亡机制诱导肝癌细胞死亡。

2012 年, Dixon 等首次报道铁死亡 (ferroptosis) 这一新型细胞死亡方式^[20]。它主要是细胞内超载的游离铁诱导脂类发生过氧化反应,生成脂质过氧化物超过细胞内抗氧化系统的代偿,进而诱导细胞发生死亡。其发生时主要表现为线粒体缩小、嵴变少、膜致密增厚,伴随铁超载、GPX4 活性降低及 GSH 的消耗^[13]。通过我们的研究发现, DHA 诱导肝癌细胞活力下降及细胞内 ROS 水平上升时,细胞内伴随着 GSH 水平下降及 GPX4 蛋白的下调。通过将 DHA 与铁死亡小分子抑制剂联合处理肝癌细胞可以发现,不同铁死亡抑制剂分子对 DHA 引起的细胞活力下降均有恢复作用,但铁螯合剂 DFO 及 Ferrostatin-1 对细胞活力恢复作用最为明显,说明铁死亡在 DHA 诱导的死亡方式中占有主要地位。在此基础上,本文进一步检测铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 对 DHA 诱导的肝癌细胞内脂质过氧化物水平、GSH 水平及 GPX4 蛋白表达的恢复。结果显示, Ferrostatin-1 可以抑制 DHA 诱导的细胞内脂质过氧化反应,恢复 DHA 导致的 GSH 水平下降及 GPX4 蛋白下调。通过这些研究发现, DHA 对肝癌细胞的增殖抑制作用及抗癌机制,可能不仅局限于细胞发生凋亡,铁死亡在 DHA 的抗肝癌作用机制中也发挥着重要的作用。但铁死亡与细胞凋亡在抑制肝癌细胞活性中是否存在相互作用及其联系机制仍有待进一步研究。

参考文献 (References)

[1] Kim J, Jung Y. Radiation-induced liver disease: current understanding and future perspectives [J]. *Exp Mol Med*, 2017,

49(7): e359
[2] 黄乾荣, 张玲. 原发性肝癌治疗研究新进展 [J]. *实用医学杂志* (Huang QR, Zhang L. New progress in the treatment of primary liver cancer [J]. *J Pract Med*), 2016, **32** (14): 2275-2278
[3] 祝普利, 尹超, 冯建龙. 原发性肝癌综合治疗进展 [J]. *临床肝胆病杂志* (Zhu P L, Yin C, Feng J L. Progress in comprehensive treatment of primary liver cancer [J]. *J Clin Hepatol*), 2015, **31** (6): 965-968
[4] 孙劲松, 陈桂明, 龙志雄, 等. 原发性肝癌综合治疗进展 [J]. *中国肿瘤临床与康复* (Sun JS, Chen GM, Long ZX, et al. Advances in comprehensive therapy for primary hepatocellular carcinoma [J]. *Chin J Clin Oncol Rehabil*), 2005, **12** (5): 468-470
[5] Flobinus A, Taudon N, Desbordes M, et al. Stability and antiviral activity against human cytomegalovirus of artemisinin derivatives [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, **69** (1): 34-40
[6] Wu C, Liu J, Pan X, et al. Design, synthesis and evaluation of the antibacterial enhancement activities of amino dihydroartemisinin derivatives [J]. *Molecules*, 2013, **18** (6): 6866-6882
[7] Shi X, Wang L, Li X, et al. Dihydroartemisinin induces autophagy-dependent death in human tongue squamous cell carcinoma cells through DNA double-strand break-mediated oxidative stress [J]. *Oncotarget*, 2017, **8** (28): 45981-45993
[8] Du XX, Li YJ, Wu CL, et al. Initiation of apoptosis, cell cycle arrest and autophagy of esophageal cancer cells by dihydroartemisinin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, **67** (5): 417-424
[9] Wang Z, Hu W, Zhang JL, et al. Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity [J]. *FEBS Open Bio*, 2012, **2**: 103-112
[10] Zhang CZ, Zhang H, Yun J, et al. Dihydroartemisinin exhibits antitumor activity toward hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, **83** (9): 1278-1289
[11] Qin G, Zhao C, Zhang L, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis preferentially via a Bim-mediated intrinsic pathway in hepatocarcinoma cells [J]. *Apoptosis*, 2015, **20** (8): 1072-1086
[12] Ba Q, Zhou N, Duan J, et al. Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via transferrin receptor-1 [J]. *PLoS One*, 2012, **7** (8): e42703
[13] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, **156** (1-2): 317-331
[14] Manz DH, Blanchette NL, Paul BT, et al. Iron and cancer: recent insights [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, **1368** (1): 149-161
[15] Jeong SM, Lee J, Finley LW, et al. SIRT3 regulates cellular iron metabolism and cancer growth by repressing iron regulatory protein 1 [J]. *Oncogene*, 2015, **34** (16): 2115-2124
[16] Mittler R, Darash-Yahana M, Sohn YS, et al. NEET proteins: a new link between iron metabolism, reactive oxygen species, and cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, **30** (8): 1083-1095
[17] Ooko E, Saeed ME, Kadioglu O, et al. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells [J]. *Phytomedicine*, 2015, **22** (11): 1045-1054
[18] Lin R, Zhang Z, Chen L, et al. Dihydroartemisinin (DHA) induces ferroptosis and causes cell cycle arrest in head and neck carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, **381** (1): 165-175
[19] Yu H, Guo P, Xie X, et al. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, **21** (4): 648-657
[20] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, **149** (5): 1060-1072