

双氢青蒿素诱导肿瘤细胞铁死亡及其机制研究

费伟东¹, 叶轶青¹, 陈 玥¹, 吴晓东², 宋倩倩¹, 姚 瑶¹, 郑彩虹^{1*}

1. 浙江大学医学院附属妇产科医院 药剂科, 浙江 杭州 310006

2. 浙江大学医学院附属妇产科医院 妇科肿瘤, 浙江 杭州 310006

摘要: 目的 阐明双氢青蒿素(DHA)诱导肿瘤细胞铁死亡的作用及其机制。方法 利用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)检测DHA与FeSO₄体外芬顿样(Fenton)反应生成氧自由基(•OH)的能力; MTT法检测DHA对人肝癌HepG2细胞的毒性(包括FeSO₄与去铁胺预处理组)。MTT法考察谷胱甘肽(GSH)与铁死亡抑制剂(Fer-1)对DHA细胞毒性的影响; 采用DCFH-DA染料考察DHA(包括FeSO₄预处理组)诱导的细胞内活性氧的生成能力; 采用C11-BODIPY^{581/591}与DiO分别考察DHA(包括FeSO₄预处理组)对细胞内脂质过氧化物生成能力以及细胞膜结构的影响; 利用谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX-4)试剂盒测定DHA(包括FeSO₄预处理组)对HepG2细胞内GPX-4活性的影响。结果 Fe²⁺能够催化DHA发生芬顿样反应并生成•OH; DHA的半数抑制浓度(IC₅₀)为(39.96±8.78) μmol/L, FeSO₄与去铁胺分别能够增加或者降低DHA的细胞毒性; DHA处理后细胞内活性氧含量与脂质过氧化物含量升高, 细胞形态变大, 细胞膜呈散点状分布并呈现解离状态。FeSO₄预处理组与DHA组相比进一步增加细胞内活性氧含量与脂质过氧化物含量, 并且细胞膜形态完全破坏。FeSO₄能够增强DHA对GPX-4活性的抑制作用。结论 DHA通过芬顿样反应升高细胞内活性氧而最终诱导肿瘤细胞铁死亡。另外, 外源性铁可以加速DHA发生芬顿样反应进而加速肿瘤细胞铁死亡的发生与发展。

关键词: 双氢青蒿素; 铁死亡; 芬顿样反应; 氧自由基; 肿瘤细胞; 外源性铁; 谷胱甘肽过氧化物酶4

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)13-3473-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.015

Ferroptosis-induced effect and mechanism of dihydroartemisinin on tumor cells

FEI Wei-dong¹, YE Yi-qing¹, CHEN Yue¹, WU Xiao-dong², SONG Qian-qian¹, YAO Yao¹, ZHENG Cai-hong¹

1. Department of Pharmacy, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

2. Department of Gynecologic Oncology, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of dihydroartemisinin (DHA) in inducing ferroptosis of tumor cells. **Methods** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine was used to detect the oxygen free radicals (•OH) formed by DHA and FeSO₄ *in vitro*. The cytotoxicity of DHA on HepG2 cells was detected by MTT method (including FeSO₄ or deferoxamine pretreated groups). MTT assay was used to investigate the influence of glutathione (GSH) and inhibitor (Fer-1) on cytotoxicity of DHA; DCFH-DA dye was used to investigate intracellular reactive oxygen species induced by DHA (including FeSO₄ pretreated groups). C11-BODIPY^{581/591} and DiO dye were used to examine the influence of DHA (including FeSO₄ pretreated groups) on intracellular lipid peroxide formation and cell membrane structure; Glutathione peroxidase assay kit was used to explore the influence of DHA (including FeSO₄ pretreated groups) on intracellular activity GPX-4 in HepG2 cells. **Results** Fenton-like reaction occurred between DHA and Fe²⁺, and •OH was produced during the reaction. The half-inhibitory concentration (IC₅₀) of DHA was (39.96 ± 8.78) μmol/L. FeSO₄ and deferoxamine could increase or decrease the cytotoxicity of DHA, respectively. After treated with DHA, the intracellular content of reactive oxygen species and lipid peroxide was increased, the cell morphology became larger, and the cell membrane was broken. Compared with the DHA treated group, the FeSO₄ pretreated group further increased the intracellular reactive oxygen species and lipid peroxide content, and the cell membrane morphology was completely destroyed. FeSO₄ could also enhance the inhibitory effect of DHA on GPX-4

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873838); 浙江省自然科学基金(LQ20H300002); 浙江省自然科学基金(LY16H160025); 浙江省医药卫生科技项目(2018KY429)

作者简介: 费伟东(1991—), 男, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 药师, 主要从事肿瘤铁死亡相关研究。E-mail: feiweidong@zju.edu.cn

*通信作者 郑彩虹(1966—), 女, 浙江绍兴人, 博士研究生, 主任药师, 主要从事妇产科领域药物的靶向及缓控释研究。

Tel: (0571)89991730 E-mail: chzheng@zju.edu.cn

activity. **Conclusion** DHA increases intracellular reactive oxygen species through Fenton-like reaction and ultimately induces ferroptosis of tumor cells. In addition, exogenous iron can accelerate the Fenton-like reaction of DHA and accelerate the occurrence and development of ferroptosis of tumor cells.

Key words: dihydroartemisinin; ferroptosis; Fenton-like reaction; oxygen free radicals; tumor cells; exogenous iron; glutathione peroxidase-4

据世界卫生组织统计,近年来,全世界恶性肿瘤的发病率呈不断上升趋势^[1],每年有超过 1 000 万人死于癌症^[2],癌症严重威胁着人类的生命和健康。我国肿瘤发病率 90 年代已达到 0.127%,并且过去 20 年中呈总体上升趋势。目前临床上常用的抗肿瘤药物具有选择性差、毒副作用强以及易产生耐药等缺点,严重限制了其疗效的发挥^[3-4]。中药兼具抗肿瘤、副作用小、耐药性低等优点。因此,从中药活性成分中发现新的抗癌药物及治疗策略具有非常重要的意义。

青蒿素 (artemisinin, ART) 是我国诺贝尔医学奖获得者屠呦呦团队于 1971 年首先从菊科植物黄花蒿中分离出来的具有过氧化基团的倍半萜内酯化合物^[5-6],它的衍生物主要包括双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA)、青蒿琥酯 (artesunate, ARS)、蒿甲醚 (artemether, AM) 和蒿乙醚 (arteether, AE),它们均具有显著的抗疟作用^[7]。其中 DHA 由 ART 经四氢硼钠还原而成,是 ART 及其衍生物在体内的活性代谢产物^[8-10]。近年来,随着对 DHA 药理作用研究的深入,发现其除了具有显著的抗疟疾疗效以外,还具有广谱的抗肿瘤作用。DHA 对肝癌、乳腺癌、卵巢癌等均具有很好的抑制作用,而对正常组织细胞的毒性较低^[11-14]。上述发现使得 DHA

日益受到国内外研究者的关注。现有的研究表明,DHA 的抗肿瘤机制主要与结构中的过氧桥键有关,其通过打破肿瘤细胞内的氧化还原平衡而诱导肿瘤细胞死亡^[15-17]。然而,其内在作用机制以及是否存在其他作用途径均尚未阐明。

铁死亡 (ferroptosis) 是一种不同于细胞凋亡、自噬、坏死和焦亡的调节性细胞死亡方式,是因铁依赖性活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的异常堆积而导致氧化还原平衡失调的细胞死亡方式^[18]。铁死亡的主要过程如图 1 所示,主要为 (i) 细胞内 H_2O_2 在内源性 Fe^{2+}/Fe^{3+} 的催化下形成活性氧自由基 ($\cdot OH$); (ii) 细胞膜脂上的多聚不饱和脂肪酸 (PL-PUFA-OH) 可被 ROS (含 $\cdot OH$ 、 H_2O_2) 等氧化,形成脂质过氧化物 (PL-PUFA-OOH)^[19]; (iii) PL-PUFA-OOH 转变成有毒的脂质自由基^[20],导致细胞膜脂的多聚不饱和脂肪酸破碎^[21],引发细胞死亡。DHA 分子结构中有过氧桥键,具有被金属离子 (Fe^{2+}/Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 等) 催化生成 $\cdot OH$ 的潜质。因此,DHA 可能是通过铁死亡途径诱导肿瘤细胞死亡。基于以上理论,本研究以人肝癌 HepG2 细胞为研究对象,旨在阐明 DHA 在诱导肿瘤细胞铁死亡方面的作用及其机制,为 DHA 拓展临床抗肿瘤的适应症奠定基础。

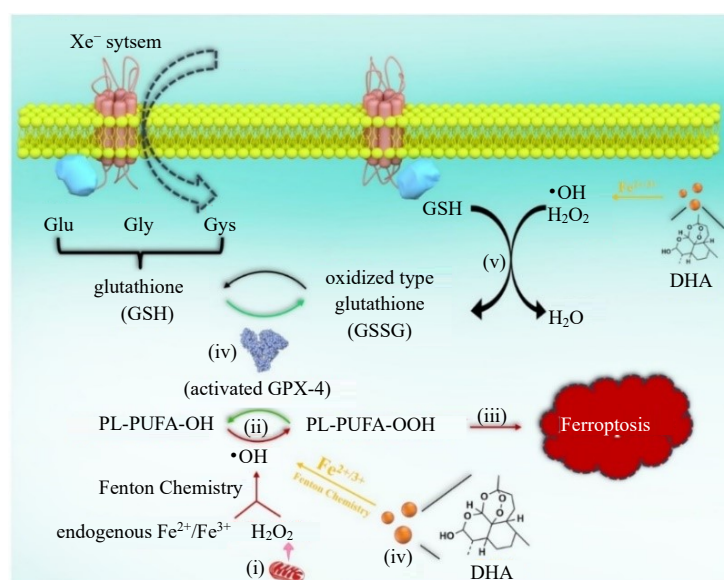


图 1 铁死亡发生与发展机制以及 DHA 诱导铁死亡的作用机制

Fig. 1 Occurrence and development mechanism of ferroptosis and mechanism of DHA-induced ferroptosis

1 材料

1.1 药物与试剂

DHA (质量分数 98%, 批号 J1818126) 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (质量分数 99%, 批号 F1578425) 购于上海阿拉丁试剂有限公司; 谷胱甘肽 (GSH, 批号 C10320884) 和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, 批号 Z15428724) 购于上海麦克林生化科技有限公司; DiO 细胞膜染料 (批号 1993024) 和 C11-BODIPY^{581/591} (批号 2090572) 购自美国赛默飞世尔科技有限公司; DCFH-DA (批号 C01A10L84586) 购自上海源叶生物科技有限公司; 去铁胺 (desferrioxamine, DFO) 和 ferrostatin-1 (Fer-1) 购于美国 MedChemExpress 公司; DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶购于美国 Gibco 生物科技公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

FV1200 激光共聚焦显微镜, 日本 Olympus 公司; Varioskan Flash 3001 酶标仪、3111 型细胞恒温培养箱, 美国赛默飞世尔科技公司; MDI6000B 荧光倒置显微镜, 德国徕卡集团有限公司; AG22331 Eppendorf 离心机, 德国艾本德股份公司。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞源于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, HepG2 在含有 10% FBS 和 1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中进行培养。细胞状态良好并生长至对数期时进行实验。

2 方法

2.1 体外芬顿样反应 (Fenton) 生成 ROS 研究

为检测 DHA 与 Fe^{2+} 发生芬顿样反应产生 $\cdot\text{OH}$ 的能力, 将 200 μL 的 TMB (10 mmol/L) 加入到含有 FeSO_4 (10 mmol/L) 和 DHA (0、1、2、4、8 mmol/L) 的混合溶液中并反应 6 h。待 TMB 选择性捕获 $\cdot\text{OH}$ 后, 用酶标仪扫描反应体系的吸光度 (A) 值 (400~800 nm)。另外, 用酶标仪测定 DHA 溶液、 FeSO_4 溶液与 DHA + FeSO_4 反应体系在不同时间点 (0.5、1、2、4、8、12 h) 在波长 650 nm 时的 A 值。

2.2 细胞毒性研究

本研究用 MTT 检测法评估 DHA 溶液的细胞毒性。将细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板中, 并在 5% CO_2 、37 °C 下培养过夜。然后将细胞与含有不同浓度的 DHA 溶液 (1~200 $\mu\text{mol/L}$) 的

培养基孵育 48 h, 同时设正常培养的细胞作为对照组。将细胞与混合有 MTT (5 mg/mL) 的培养基在 37 °C 温育 4 h。结束后弃去上清液并将沉淀物溶于 150 μL DMSO 中, 振荡器振摇 15 min 后使用酶标仪在 490 nm 波长下测量所得溶液的 A 值, 并计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

为考察外源性铁与铁清除剂对 DHA 细胞毒性的影响, 首先将含有 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 或 DFO (50 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液与贴壁后的 HepG2 细胞分别共孵育 2、4 h, 再加入不同浓度的 DHA 溶液 (1~200 $\mu\text{mol/L}$) 共孵育 48 h。其余操作同上, 计算细胞存活率。

为考察 GSH 与铁死亡抑制剂 (Fer-1) 对 DHA 细胞毒性的影响, 将不同浓度的 GSH (0、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 或 Fer-1 (0、10、20、40 nmol/L) 与 HepG2 细胞共培养 4 h, 结束后弃去上清液并加入 200 μL 空白培养液或者含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的培养液 (80 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 2 h。然后再弃去培养液并加入含 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液, 共培养 48 h。其余操作同上, 计算细胞存活率。

2.3 细胞内 ROS 测定

为检测细胞内 ROS 水平, 将细胞接种于 6 孔板 (2×10^5 个/孔), 并在 37 °C、5% CO_2 下培养过夜, 弃去上清液后加入 2 mL 空白培养液或者含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (80 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液孵育 2 h。结束后弃去培养液并加入游离 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$) 并培养 6 h。然后再弃去培养液, 每孔中加入 DCFH-DA (50 $\mu\text{mol/L}$) 并在培养箱中继续孵育 30 min。最后吸去 DCFH-DA, PBS 液洗 3 次, 在荧光显微镜上测定荧光强度, 激发波长和检测波长分别为 488、525 nm。全程避光操作。

2.4 细胞内脂质过氧化物水平测定

采用激光共聚焦显微镜测定细胞内脂质过氧化物的含量。将 HepG2 细胞接种在共聚焦培养皿 (四室) 上 (1.5×10^4 个/孔), 并在 37 °C、5% CO_2 下培养过夜, 弃去上清液后加入 500 μL 空白培养液或者含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (80 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液孵育 2 h。结束后弃去培养液并加入游离 DHA (50 $\mu\text{mol/L}$), 培养 6 h。然后细胞用 C11BODIPY^{581/591} (2 $\mu\text{mol/L}$) 染色并 37 °C 温育 30 min。PBS 洗 3 次后用 4% 多聚甲醛固定 10 min。PBS 洗 3 次后再用 DAPI 复染 10 min。最后 PBS 洗 3 次, 并用激光共聚焦显微镜在

580 nm 波长下进行测定, 全程避光操作。

2.5 细胞内谷胱甘肽过氧化物酶-4 (GPX-4) 活性测定

使用 GSH-Px 试剂盒测定细胞内 GPX-4 的活性。将 HepG2 细胞接种在 6 孔板上 (2×10^5 个/孔), 并在 37°C 、5% CO_2 下培养过夜。弃去上清液后加入 2 mL 空白培养液或者含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($80 \mu\text{mol/L}$) 的培养液孵育 2 h。弃去培养液后再加入游离 DHA (0 、 10 、 25 、 $50 \mu\text{mol/L}$) 并培养 6 h。收集细胞裂解物并根据试剂盒说明书进行测量。最后用酶标仪测量 340 nm 处的 A 值。

2.6 细胞膜形态变化研究

用激光共聚焦显微镜细胞膜形态变化。将 HepG2 细胞接种在共聚焦小皿上 (1.5×10^4 个/孔), 在 37°C 、5% CO_2 下培养过夜, 弃取上清液后加入 $500 \mu\text{L}$ 空白培养液或者含 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($80 \mu\text{mol/L}$) 的培养液孵育 2 h。结束后弃去培养液加入游离 DHA ($50 \mu\text{mol/L}$) 并培养 24 h。然后细胞用 DiO 细胞膜染料 (1 mmol/L) 孵育 3 min。PBS 洗 3 次后用 4% 多聚甲醛固定 10 min。PBS 洗 3 次后再用 DAPI 复染 10 min。最后 PBS 洗 3 次并用激光共聚焦显微镜在 580 nm 波长下进行测定, 全程避光操作。

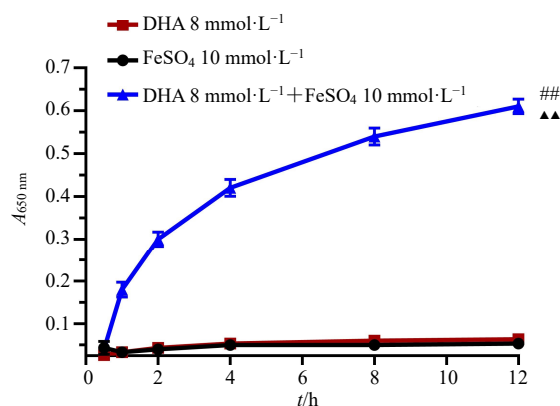
3 结果

3.1 DHA 体外 Fenton 反应生成 ROS 研究

本研究用 TMB 标记 DHA 和 Fe^{2+} 通过 Fenton 反应产生的 $\cdot\text{OH}$, 并用荧光倒置显微镜进行观察。TMB 可以被高反应活性 $\cdot\text{OH}$ 氧化为蓝绿色, 在约 650 nm 处具有最大 A 值。如图 2 所示, 单独的 Fe^{2+} 和 DHA 都不会对 TMB 的 A 值增加产生可检测的影响。相比之下, DHA 溶液中加入 Fe^{2+} 导致 TMB 水溶液快速变色, DHA 的浓度越高, 反应体系的颜色越深, 650 nm 处的 A 值越大 (图 2、3)。上述结果证实了 DHA 能够在 Fe^{2+} 的催化下发生 Fenton 反应并产生 $\cdot\text{OH}$ 。

3.2 DHA 对 HepG2 细胞毒性研究

MTT 结果显示, 在 DHA 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 的时候, 对 HepG2 细胞的生长基本没有影响。随着共孵育 DHA 溶液浓度的增加, 细胞生长显著受到抑制, DHA 溶液的半数抑制浓度 (IC_{50}) 值为 (39.96 ± 8.78) $\mu\text{mol/L}$ 。本研究观察 FeSO_4 与 DFO 对 DHA 细胞毒性的影响, $80 \mu\text{mol/L}$ 的 FeSO_4 或 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 DFO 与细胞共孵育 48 h 后, 细胞存活率分别为 (101.4 ± 7.1) % 与 (99.7 ± 6.8) %, 说明上述浓度的 FeSO_4



与 DHA 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 FeSO_4 组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs DHA group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs FeSO_4 group

图 2 FeSO_4 、DHA 或两者水溶液与 TMB 共孵育后在 650 nm 处的吸收 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Absorption of TMB solution incubated with DHA, FeSO_4 or solution of DHA and FeSO_4 at 650 nm ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

和 DFO 对细胞没有抑制作用。如图 4 所示, 不同浓度的 FeSO_4 能够增加 DHA 对 HepG2 细胞的毒性, 并且加入的 FeSO_4 的浓度越大, DHA 增加的毒性越大。DHA + $40 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 组与 DHA + $80 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 组的 IC_{50} 值分别为 (29.29 ± 4.53)、(21.38 ± 1.87) $\mu\text{mol/L}$ 。DHA + $80 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 组的 IC_{50} 值显著小于 DHA 溶液组 ($P < 0.05$)。DHA + $50 \mu\text{mol/L}$ DFO 组的 IC_{50} 值为 (55.78 ± 9.53) $\mu\text{mol/L}$, 说明 DFO 能够减弱 DHA 的细胞毒性。

3.3 铁死亡抑制剂对 DHA 细胞毒性的影响

还原性 GSH 能够激活 GPX-4 进而抑制细胞铁死亡的发生与发展^[19]。本研究探究了还原性 GSH 与铁死亡抑制剂 Fer-1 对 DHA 溶液, DHA + $40 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 处理组和 DHA + $80 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 处理组细胞毒性的影响。结果如图 5 所示, $5 \mu\text{mol/L}$ 的 GSH 能显著降低 DHA 溶液组和 DHA + $80 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 组的细胞毒性 ($P < 0.05$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 的 GSH 能显著降低 DHA + $40 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 组的细胞毒性 ($P < 0.05$)。由图 6 可见, 20 nmol/L 的 Fer-1 能够显著降低 DHA 溶液组、DHA + $40 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 处理组和 DHA + $80 \mu\text{mol/L}$ FeSO_4 处理组的细胞毒性 ($P < 0.05$)。

3.4 细胞内 ROS 测定

DCFH-DA 是非标记性的氧化敏感型荧光探针, DCFH-DA 本身没有荧光, 细胞内的 ROS 可以将其氧化并生成有绿色荧光的物质^[21]。因此 DCFH-DA 可以判定细胞内 ROS 的水平。本研

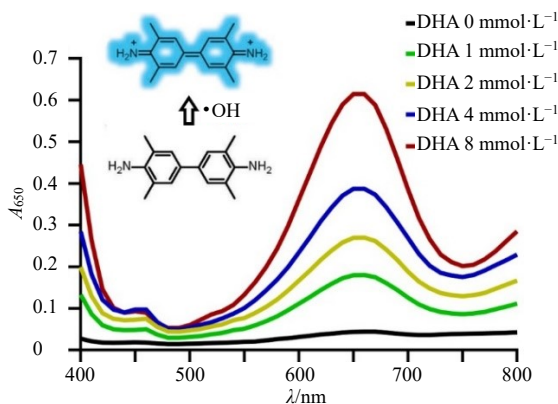


图 3 FeSO_4 和不同浓度的 DHA 混合溶液与 TMB 共孵育后在 400~800 nm 紫外扫描图谱

Fig. 3 UV-vis spectra (400—800 nm) of TMB solution incubated with different concentrations of DHA with FeSO_4

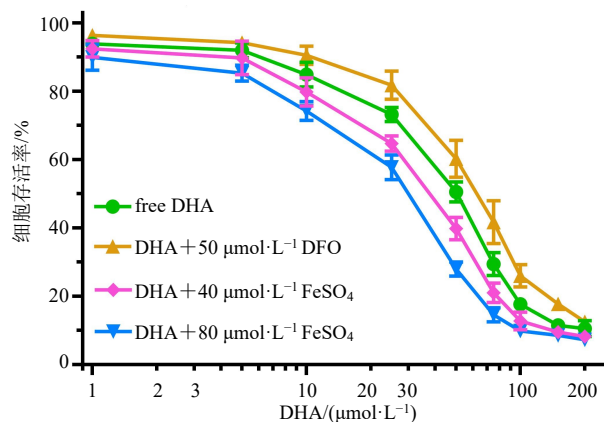


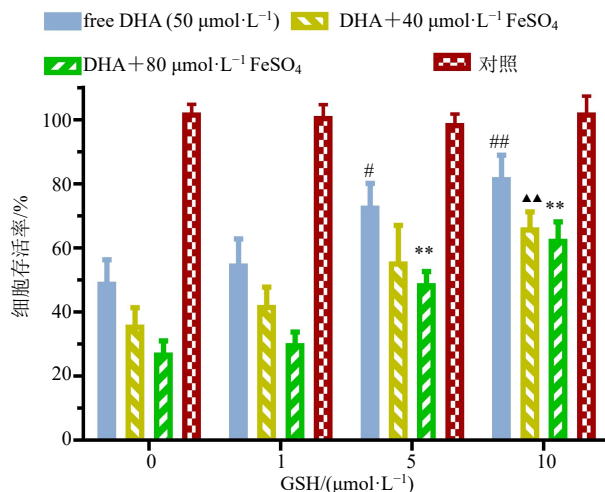
图 4 DHA 的细胞毒性以及 FeSO_4 或 DFO 对 DHA 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Cytotoxicity of DHA on HepG2 cells and influence of FeSO_4 or DFO on cytotoxicity of DHA ($\bar{x} \pm s, n=6$)

究用荧光倒置显微镜观察了 DHA 溶液与 DHA+80 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 处理后的 HepG2 细胞内的 ROS (含 $\cdot\text{OH}$) 的生成情况。如图 7 所示, HepG2 细胞自身有微弱的绿色荧光, 说明 HepG2 细胞本身具有一定的 ROS 生成能力。与 DHA 共孵育以后, 细胞内荧光强度显著增强, 绿色荧光分布到整个细胞。当 Fe^{2+} 预处理后, 细胞浆内荧光强度进一步增强。

3.5 细胞内脂质过氧化物测定

细胞内脂质过氧化物的水平是铁死亡的重要指标^[22]。本研究用氧化敏感型脂质过氧化物荧光探针 C11-BODIPY^{581/591} 考察细胞内脂质过氧化物的含量。如图 8 所示, 对照组 HepG2 细胞内脂质过氧化

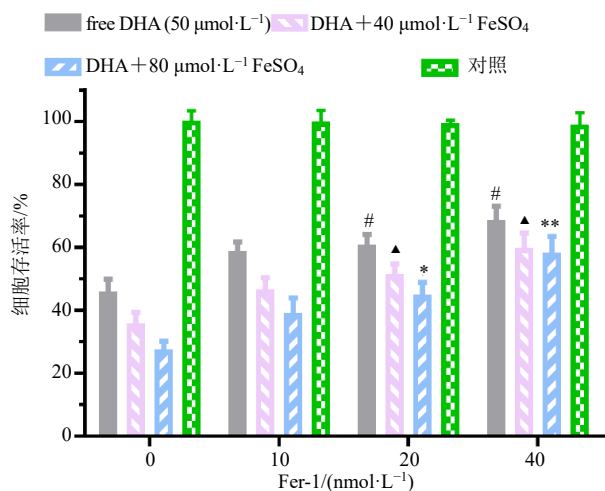


与 $\text{GSH}=0$, free DHA 组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$; 与 $\text{GSH}=0$, DHA+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 组比较: $^{\Delta\Delta}P<0.01$; 与 $\text{GSH}=0$, DHA+80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 组比较: $^{**}P<0.01$

$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ vs $\text{GSH}=0$, free DHA group; $^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs $\text{GSH}=0$, DHA+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 group; $^{**}P<0.01$ vs $\text{GSH}=0$, DHA+80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 group

图 5 GSH 对 DHA 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Influence of GSH on cytotoxicity of DHA ($\bar{x} \pm s, n=6$)



与 $\text{Fer-1}=0$, free DHA 组比较: $^{\#}P<0.05$; 与 $\text{Fer-1}=0$, DHA+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 组比较: $^{\Delta}P<0.05$; 与 $\text{Fer-1}=0$, DHA+80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$

$^{\#}P<0.05$ vs $\text{Fer-1}=0$, free DHA group; $^{\Delta}P<0.05$ vs $\text{Fer-1}=0$, DHA+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs $\text{Fer-1}=0$, DHA+80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FeSO_4 group

图 6 Fer-1 对 DHA 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Influence of Fer-1 on cytotoxicity of DHA ($\bar{x} \pm s, n=6$)

物的荧光强度较弱。与 DHA 共孵育以后, 细胞内荧光强度显著增强, 绿色荧光分布在细胞浆。当 Fe^{2+} 预处理后, 细胞内荧光强度进一步增强。

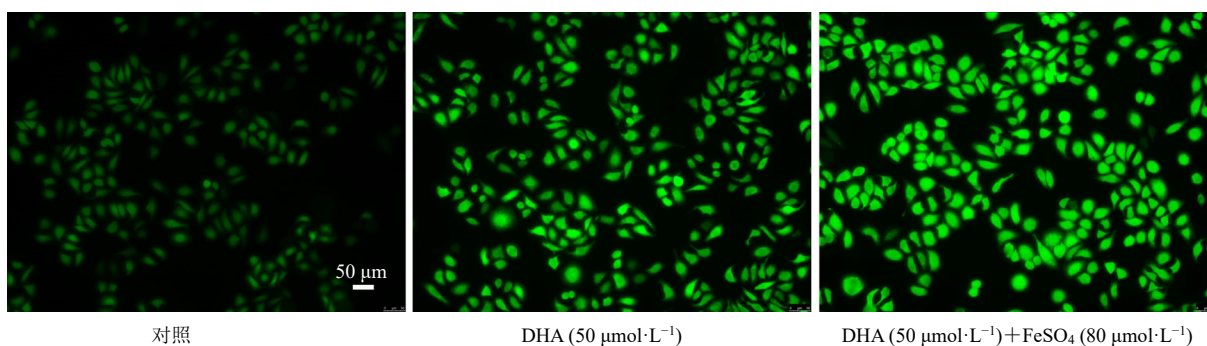


图 7 各组 HepG2 细胞内 ROS 含量分析
Fig. 7 ROS content analysis of HepG2 cells in each group

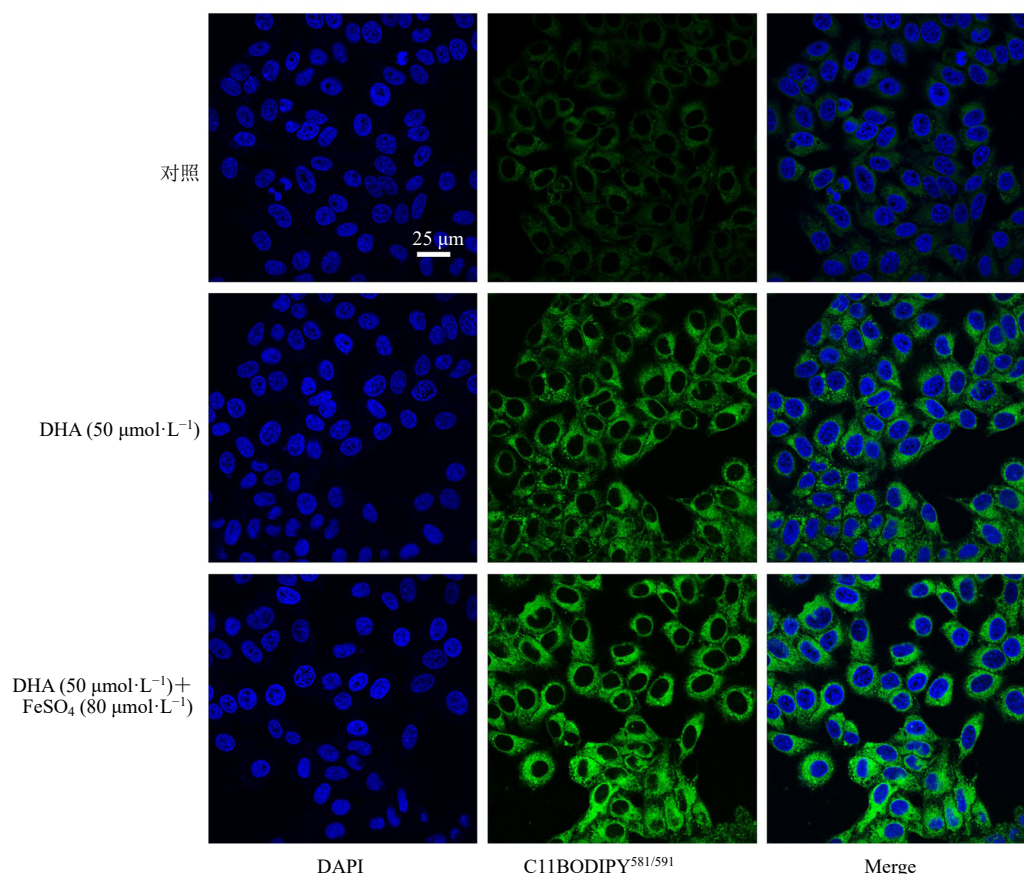


图 8 各组 HepG2 细胞内脂质过氧化物含量分析
Fig. 8 Lipid peroxides of HepG2 cells in each group

3.6 细胞内 GPX-4 活性研究

细胞内依赖于 GSH 的 GPX-4 可以将有毒的 PL-PUFA-OOH 还原为无毒的 PL-PUFA-OH^[20], 从而减少脂质自由基的积累来阻止铁死亡的发生与发展 (图 1-iv)。因此 GPX-4 是铁死亡发生与发展的重要标记物。本研究用 GPX-4 检测试剂盒分析 DHA 溶液与 DHA+80 μmol/L FeSO₄ 处理后 HepG2 细胞内的 GPX-4 的活性。如图 9 所示, DHA 浓度为 10

μmol/L 时, 与对照组相比, 细胞内 GPX-4 的活性并没有显著变化。当 DHA 浓度为 50 μmol/L, GPX-4 的活性显著降低。Fe²⁺预处理后, 25 μmol/L 的 DHA 就能显著降低细胞内 GPX-4 的活性。上述结果说明 DHA 能够抑制细胞内 GPX-4 的活性, Fe²⁺能够进一步增强 DHA 对 GPX-4 的抑制作用。

3.7 细胞膜形态变化研究

细胞膜脂的多聚不饱和脂肪酸破碎是细胞铁死

亡的最直接原因。本研究用 DiO 复染 DHA 溶液与 DHA + 80 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 共孵育以后的细胞,并用共聚焦显微镜观察细胞膜的变化。如图 10 所示,对照

组 HepG2 细胞膜完整,具有均匀的荧光,说明细胞膜厚度均一。细胞膜外侧可见触角与细胞分泌的囊泡。DHA 溶液共孵育以后,细胞形态变大,细胞膜

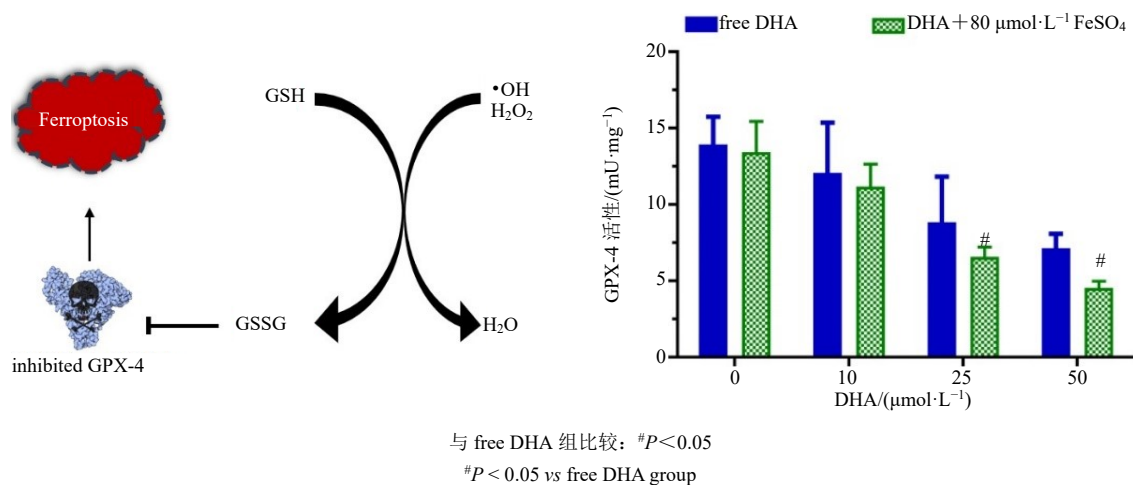


图 9 DHA 处理后 HepG2 细胞内 GPX-4 的活性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Determination of GPX-4 activity in HepG2 cells treated with DHA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

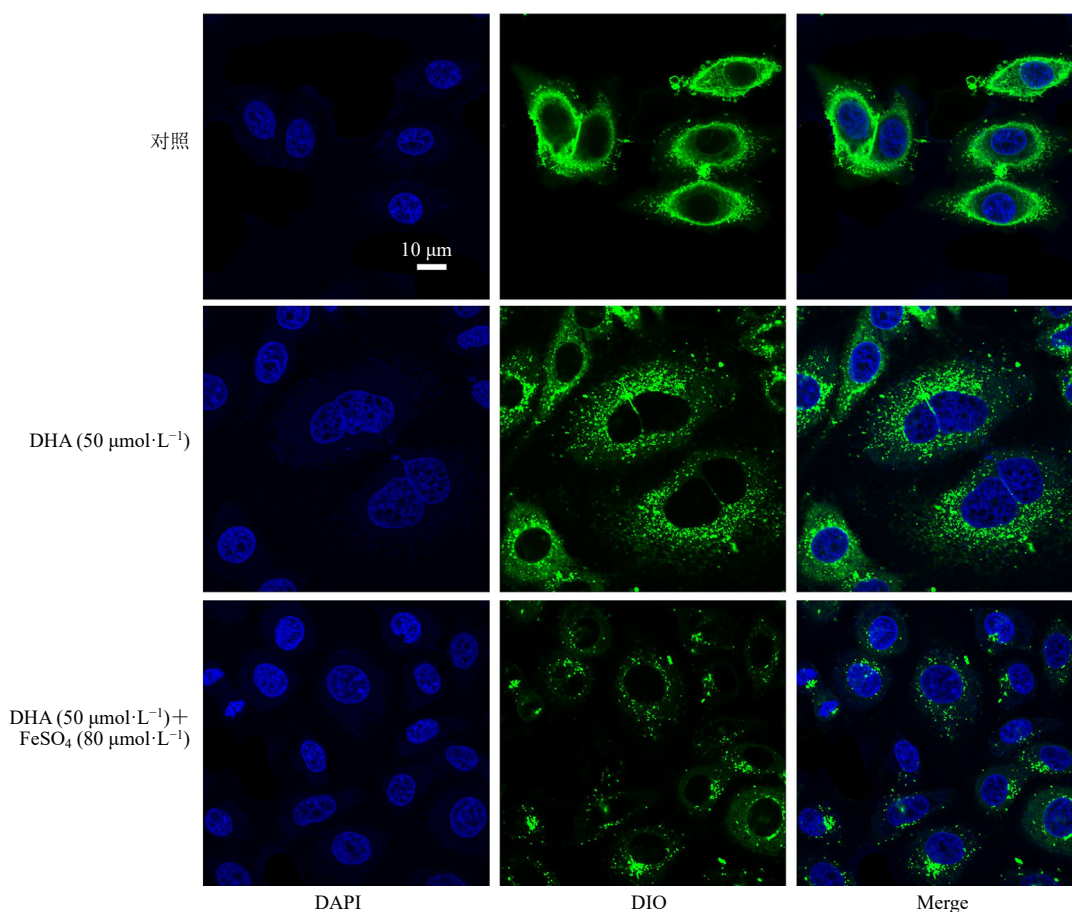


图 10 DHA 处理后 HepG2 细胞膜形态

Fig. 10 Cell membrane morphology of HepG2 cells treated with DHA

呈散点状分布,有向细胞外侧散布的趋势,说明细胞膜呈解离状态。此外,部分细胞膜荧光圈不完整。当加入 Fe^{2+} 后,细胞形态不完整,结构严重破坏,细胞膜荧光变暗,说明细胞膜结构大部分缺失。

4 讨论

2012 年, Dixon 等^[23]在研究 Erastin 杀死 RAS 突变的肿瘤细胞作用机制时发现一种铁依赖性的细胞死亡形式,并将其命名为铁死亡,铁死亡主要是细胞内“铁”依赖脂质氧自由基异常增高、氧化还原稳态失衡而致。随着铁死亡机制的不断深入研究,许多传统药物更真实的作用机制逐渐被阐明。DHA 是青蒿素及其衍生物在体内的活性代谢产物,其抗肿瘤作用与其结构中的过氧桥键有关,但其机制并未完全明确^[24]。本研究首先将 DHA 与 Fe^{2+} 在体外进行反应,反应产物中加入 TMB 后在 650 nm 处出现强吸收,说明 DHA 在 Fe^{2+} 的催化下发生 Fenton 反应并生成 $\cdot\text{OH}$ 。DHA 与 HepG2 细胞共孵育后,细胞内 ROS 的含量显著升高,这是由于 DHA 在内源性铁的催化下发生 Fenton 反应所致。所生成的 $\cdot\text{OH}$ 能够将 PL-PUFA-OH 氧化成 PL-PUFA-OOH。因此, DHA 共孵育以后,细胞内脂质过氧化物的荧光强度显著增强。另一方面, $\cdot\text{OH}$ 能够将 GSH 氧化成氧化型谷胱甘肽 (GSSG),进而导致依赖于 GSH 的 GPX-4 活性降低。GPX-4 活性的降低将导致 PL-PUFA-OOH 的还原受到阻碍。最终, DHA 导致细胞形态变大,细胞膜呈散点状分布并且向细胞外侧扩散。细胞膜破碎解离正是引起铁死亡最直接的原因。上述研究充分表明, DHA 是通过铁死亡途径诱导肿瘤细胞死亡。

许多研究发现, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 能够增加 DHA 的抗肿瘤活性^[25-26],但机制并未完全明确。本研究发现 FeSO_4 能够增加 DHA 的细胞毒性,这是由于外源性铁在经过一系列转化以后经铁转运蛋白进入肿瘤细胞^[27-28]。细胞内 Fe^{2+} 浓度越高,催化 DHA 发生 Fenton 反应越强烈。因此, DHA 与 FeSO_4 共孵育组的肿瘤细胞内 ROS、脂质过氧化物含量与 DHA 组比较进一步增加,导致细胞膜破裂的作用更加强烈。而能够络合 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 的 DFO 能够降低 DHA 的细胞毒性,这是由于 Fenton 反应受到抑制。上述结果说明 DHA 诱导肿瘤细胞铁死亡的作用受到 Fe^{2+} 的调控。含铁制剂有望与 DHA 协同用于抗肿瘤。此外,肿瘤细胞比正常细胞表达更多的转铁蛋白受体,因此肿瘤细胞内通常含有更高的内源性铁^[29],这是

DHA 对肿瘤细胞具有特异性抑制作用的主要原因。

综上,本研究清晰地阐述了 DHA 诱导肿瘤细胞铁死亡的作用及其机制,并证明外源性铁能够加速 DHA 发生 Fenton 反应,进而加剧铁死亡诱导作用。本研究深入阐明了 DHA 的抗肿瘤机制,为扩展其临床抗肿瘤的适应症奠定了理论基础。

参考文献

- [1] O'Regan P, Drummond E. Cancer information needs of people with intellectual disability: A review of the literature [J]. *Eur J Oncol Nurs*, 2008, 12(2): 142-147.
- [2] Higginson I J, Costantini M. Dying with cancer, living well with advanced cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(10): 1414-1424.
- [3] An Y, Zhou L, Huang Z, et al. Molecular insights into cancer drug resistance from a proteomics perspective [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2019, 16(5): 413-429.
- [4] Ngai L L, ter Veer E, van den Boorn H G, et al. TOXview: A novel graphical presentation of cancer treatment toxicity profiles [J]. *Acta Oncol*, 2019, 58(8): 1138-1148.
- [5] Harijanto P N. Malaria treatment by using artemisinin in Indonesia [J]. *Acta Med Indonesiana*, 2010, 42(1): 51-56.
- [6] 张铁军, 王于方, 刘 丹, 等. 天然药物化学史话: 青蒿素——中药研究的丰碑 [J]. *中草药*, 2016, 47(19): 3351-3361.
- [7] Atemnkeng M A, De Cock K, Plaizier-Vercammen J. Quality control of active ingredients in artemisinin-derivative antimalarials within Kenya and DR Congo [J]. *Trop Med Int Health*, 2007, 12(1): 68-74.
- [8] Zhang J, Guo L, Zhou X, et al. Dihydroartemisinin induces endothelial cell anoikis through the activation of the JNK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1896-1900.
- [9] Lin R Y, Zhang Z H, Chen L F, 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.
- [10] Rijken M J, McGready R, Boel M E, et al. Short report: Dihydroartemisinin-piperazine rescue treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy: A preliminary report [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78(4): 543-545.
- [11] Zou J, Ma Q, Sun R, et al. Dihydroartemisinin inhibits HepG2.2.15 proliferation by inducing cellular senescence and autophagy [J]. *BMB Rep*, 2019, 52(8): 520-525.
- [12] Yao Y Y, Guo Q L, Cao Y, et al. Artemisinin derivatives inactivate cancer-associated fibroblasts through

- suppressing TGF-signaling in breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 1-14.
- [13] Liu Y M, Gao S J, Zhu J, *et al.* Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11): 5704-5715.
- [14] 梁小娜, 单 淇, 周福军, 等. 双氢青蒿素诱导肿瘤细胞凋亡的信号通路研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(4): 775-780.
- [15] Yang S C, Zhang D W, Shen N, *et al.* Dihydroartemisinin increases gemcitabine therapeutic efficacy in ovarian cancer by inducing reactive oxygen species [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1): 634-644.
- [16] Greenshields A L, Shepherd T G, Hoskin D W. Contribution of reactive oxygen species to ovarian cancer cell growth arrest and killing by the anti-malarial drug artesunate [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(1): 75-93.
- [17] Dong L, Wang C, Zhen W, *et al.* Biodegradable iron-coordinated hollow polydopamine nanospheres for dihydroartemisinin delivery and selectively enhanced therapy in tumor cells [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(40): 6172-6180.
- [18] Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, *et al.* RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels [J]. *Nature*, 2007, 447(7146): 864-868.
- [19] Cheng Z Y, Li Y Z. What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An update [J]. *Chem Rev*, 2007, 107(3): 748-766.
- [20] Seiler A, Schneider M, Foerster H, *et al.* Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent-and AIF-Mediated cell death [J]. *Cell Metabol*, 2008, 8(3): 237-248.
- [21] Wang S, Li F, Qiao R, *et al.* Arginine-rich manganese silicate nanobubbles as a ferroptosis-inducing agent for tumor-targeted theranostics [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(12): 12380-12392.
- [22] Yang W S, Stockwell B R. Ferroptosis: Death by lipid peroxidation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176.
- [23] 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.
- [24] Xu C C, Deng T, Fan M L, *et al.* Synthesis and *in vitro* antitumor evaluation of dihydroartemisinin-cinnamic acid ester derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 107: 192-203.
- [25] Efferth T, Benakis A, Romero M R, *et al.* Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron [J]. *Free Rad Biol Med*, 2004, 37(7): 998-1009.
- [26] Moore J C, Lai H, Li J R, *et al.* Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat [J]. *Cancer Lett*, 1995, 98(1): 83-87.
- [27] Cai J, Gu B, Cao F, *et al.* A transferrin-target magnetic/ fluorescent dual-mode probe significantly enhances the diagnosis of non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40047-40059.
- [28] Habashy H O, Powe D G, Staka C M, *et al.* Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen [J]. *Breast Cancer Res Treatment*, 2010, 119(2): 283-293.
- [29] Daniels T R, Delgado T, Helguera G, *et al.* The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells [J]. *Clin Immunol*, 2006, 121(2): 159-176.