

基于铁死亡途径的五味子乙素抗肝癌细胞增殖机制及其微乳增效作用研究

罗梦玉^{1,2}, 官 鹭^{1,2}, 卢 山^{1,2}, 贺建华^{1,2}, 肖学成^{1,2}, 龚普阳³, 郭瑜婕^{1,2*}, 洪 怡^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430065

3. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 基于铁死亡途径探究五味子乙素 (schisandrin B, Sch B) 对肝癌细胞增殖的影响及其作用机制, 并通过制备成微乳以增强其抑制肝癌细胞增殖的效果。方法 采用 CCK-8 法和平板克隆法检测 Sch B 对人肝癌 HepG2、Huh7 细胞增殖的影响; 通过检测肝癌细胞内线粒体形态的变化、Fe²⁺及氧化相关指标的含量、铁死亡过程相关因子表达, 来评估 Sch B 对肝癌细胞内 Fe²⁺积累、脂质过氧化程度和铁死亡信号通路的影响。通过伪三元相图和 Box-Behnken 响应面法筛选基于 D- α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯的微乳 (D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate-based micromulsion, T-ME) 处方, 对五味子乙素微乳 (Sch B-T-ME) 的理化指标进行测定和表征。通过 CCK-8 法比较 Sch B-T-ME 与游离 Sch B 抑制肝癌细胞增殖的效果。结果 Sch B 可呈剂量相关性地抑制肝癌细胞增殖。Sch B 通过下调谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 以及上调酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4), 导致肝癌细胞抗氧化系统失调, 促进脂质过氧化, 从而引起肝癌细胞死亡。成功制备了 Sch B-T-ME, 其平均粒径为 (38.29 $\pm$ 1.97) nm, Zeta 电位为 (-4.73 $\pm$ 0.36) mV, 聚合物分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 为 0.266 $\pm$ 0.011。与游离的 Sch B 相比, Sch B-T-ME 对肝癌细胞增殖的抑制作用明显增强。结论 Sch B 能够通过铁死亡途径抑制肝癌细胞增殖, 且制备的 Sch B-T-ME 可明显增强 Sch B 抑制肝癌细胞增殖的作用。

关键词: 五味子乙素; 肝细胞癌; 铁死亡; 脂质过氧化; 微乳

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4411-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.013

Mechanism of schisandrin B on inhibiting proliferation of hepatocellular carcinoma cells based on ferroptosis pathway and its microemulsion enhancing effect

LUO Mengyu^{1,2}, GUAN Lu^{1,2}, LU Shan^{1,2}, HE Jianhua^{1,2}, XIAO Xuecheng^{1,2}, GONG Puyang³, GUO Yujie^{1,2}, HONG Yi^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China

3. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of schisandrin B (Sch B) on proliferation of hepatocellular carcinoma cells based on ferroptosis pathway, and enhance the inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation through the preparation of microemulsions. **Methods** The effects of Sch B on proliferation of HepG2 and Huh7 cells were determined by CCK-8 assay and plate cloning method; The effects of Sch B on Fe²⁺ accumulation, lipid peroxidation and ferroptosis signalling pathway were evaluated by detecting the changes of mitochondrial morphology, levels of Fe²⁺ and oxidation-related indicators, and expressions of factors related to ferroptosis process in hepatocellular carcinoma cells. The formulation of D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS)-based microemulsions (T-ME) was investigated by pseudoternary phase diagrams and Box-Behnken response surface methodology. The physicochemical indices of TPGS-based microemulsion of Sch B (Sch B-T-ME) were determined and characterised.

收稿日期: 2024-04-18

作者简介: 罗梦玉, 硕士研究生, 主要从事药物制剂新技术与新药研发。E-mail: 2236726058@qq.com

*通信作者: 洪 怡, 博士, 副教授, 主要从事药物制剂新技术与新药研发。E-mail: 46447564@qq.com

郭瑜婕, 博士, 副教授, 主要从事中药药效物质基础研究及药物制剂新技术与新方法研究。E-mail: guoyujie@hbtcm.edu.cn

The effect of Sch B-T-ME was compared with that of free Sch B in inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma cells using CCK-8 assay. **Results** Sch B could inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells in a dose-dependent manner. Sch B caused HCC cells death by down-regulating glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and up-regulating acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), leading to dysregulation of the antioxidant system in hepatocellular carcinoma cells and promoting lipid peroxidation. Sch B-T-ME was successfully prepared with an average particle size of (38.29 ± 1.97) nm, a Zeta potential of (-4.73 ± 0.36) mV and a polymer dispersity index (PDI) of 0.266 ± 0.011 . Compared with free Sch B, the inhibitory effect of Sch B-T-ME on proliferation of hepatocellular carcinoma cells was significantly enhanced. **Conclusion** Sch B inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells through ferroptosis pathway, and the prepared Sch B-T-ME can significantly enhance the inhibitory effect of Sch B on proliferation of hepatocellular carcinoma cells.

Key words: schisandrin B; hepatocellular carcinoma; ferroptosis; lipid peroxidation; microemulsion

肝癌是常见恶性肿瘤之一，恶性程度高，进展快，预后差且死亡率高^[1]。目前常用的治疗手段包括肝切除术、肝移植术、免疫治疗及放疗化疗等^[2]，但是大多数治疗方案具有较明显的不良反应，会影响患者的生存质量^[3]。越来越多的研究表明中药及其复方具有良好的抗肝癌潜力，如参芪五味子片、地五养肝方、软坚护肝片等^[4-6]。

五味子为临床常用中药，已有 2 000 多年的药用历史，《本草纲目》中记载其有“养五脏”的功效^[7]。五味子乙素（schisandrin B, Sch B）是五味子 *Schisandrae Chinensis Fructus* 中最主要的活性成分，近年来，Sch B 在抗炎、抑制多药耐药以及抗肿瘤方面备受关注，有研究表明 Sch B 在宫颈癌、乳腺癌、骨肉瘤、肝癌、肺癌、胃癌等多种肿瘤发生发展过程中起干扰作用^[8-15]。研究报道 Sch B 主要通过细胞周期阻滞、细胞凋亡、细胞活性氧（reactive oxygen species, ROS）产生和自噬等多种生物学途径实现抗肿瘤作用^[16]。铁死亡是一种程序性铁依赖的细胞死亡方式，其特征是细胞内游离 Fe^{2+} 的过量产生及脂质过氧化^[17]。细胞内积累的 Fe^{2+} 能作为非血红素含铁脂氧合酶的辅助因子参与酶促反应，还能与过氧化氢发生 Fenton 反应，生成具有强过氧化能力的羟自由基，使膜磷脂中的多不饱和脂肪酸过氧化，从而破坏细胞膜的完整性^[18]。铁死亡与抗肿瘤密切相关，癌细胞比正常细胞对铁的依赖程度更高，目前有多种抗肿瘤药物被证实可以增强细胞对铁死亡的敏感性^[19]，铁死亡诱导剂作为肝癌的治疗药物具有相当可观的前景。因此，Sch B 是否通过铁死亡途径发挥抗肝癌作用值得深入研究。

Sch B 作为五味子中的主要活性成分，其溶解性差，成药性较差，阻碍了其临床应用^[20]。已有报道将 Sch B 载于 F127 修饰脂质聚合物纳米粒上，可增强 Sch B 抑制乳腺癌转移的作用^[21]。提示有必

要开发一种 Sch B 递送载体，使其发挥更好的抗肝癌效果。微乳作为一种优良的给药载体，不仅可以提高难溶性药物的溶解度，还能促进药物的渗透和吸收，已经广泛用作多种药物的递送系统。最近一项研究表明，将氯硝柳胺制备成微乳后可明显提高其生物利用度，并增强其在患者来源的异种移植瘤肝癌小鼠模型中的抗肝癌功效^[22]。微乳的研究在制药领域具有突出的意义，且微乳制备方法简单，适合工业化大规模生产，具有较好的商业开发价值^[23]。

作为常用的保肝药物和肝癌的潜在治疗药物，Sch B 抑癌过程中是否基于铁死亡的机制尚不明确，此外，Sch B 溶解性差是影响其疗效的关键理化因素。为探讨 Sch B 抗肝癌作用以及提高 Sch B 的作用疗效，本研究通过考察 Sch B 抑制人肝母细胞瘤 HepG2 细胞和人肝癌 Huh7 细胞的增殖，探讨其机制可能与促进铁死亡有关，并将其制备成五味子乙素微乳（Sch B-T-ME），发现其微乳具有增强对肝癌细胞增殖抑制作用的功效。

1 材料

1.1 细胞株

HepG2 细胞、Huh7 细胞购自中国典型培养物保藏中心，人正常肝细胞 L02 细胞购自尚恩生物。

1.2 药品与试剂

Sch B（质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 K21171104）购自阿拉丁公司；DMEM 培养基（批号 8123224）购自美国 Gibco 公司；胎牛血清（批号 22110703）购自四季青公司；丙二醛（malondialdehyde, MDA）试剂盒（批号 20231030）购自南京建成生物工程研究所；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）抗体（批号 GR3316865-15）、 β -actin 抗体（批号 GR3396181-2）、谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione peroxidase 4, GPX4）抗体（批号 GR1000287-18）、酰基辅酶 A 合

成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 抗体 (批号 GR1002422-18) 购自英国 Abcam 公司; 胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体 (批号 6) 购自美国 CST 公司; CCK-8 试剂盒 (批号 CR2203071)、山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 CR2201040) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; ROS 检测试剂盒 (批号 080823231006)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (批号 112523240108) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 逆转录试剂盒 (批号 1117000)、SYBR 酶 (批号 132800) 购自日本 TOYOBO 公司; Fe^{2+} 检测试剂盒 (批号 WX05VZ6T0367) 购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; D - α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯 (D - α -tocopheryl polyethylene glycol succinate, TPGS, 批号 C15740353)、油酸 (批号 C15214020) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 醋酸乙酯 (批号 20220303)、异丙醇 (批号 20211209)、无水乙醇 (批号 20210530)、甲醇 (批号 20230630) 购自国药集团。

1.3 仪器

FORMA3111 型 CO_2 恒温培养箱、7500 Fast 型 PCR 仪、Nano 400 型超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Accuri[®] C6 Plus 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); Bio Tek Epoch 2 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 1645050 型蛋白质电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Milli-Q Direct 8 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司); LC-20A 型高效液相 HPLC 色谱仪 (日本岛津公司); Nano ZS90 型粒径仪 (英国马尔文公司); IX73 型显微镜 (日本奥林巴斯公司); HT7800 型透射电镜 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2、Huh7 和 L02 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 待细胞融合度为 80% 时, 用 0.25% 含 EDTA 胰酶消化并传代。

2.2 细胞活力检测

取 HepG2、Huh7 和 L02 细胞以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 分别给予 0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的 Sch B, 处理 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.3 细胞克隆形成实验

HepG2、Huh7 细胞以 800 个/孔接种于 6 孔板, 设置对照组 (不加药物) 和 Sch B 低、中、高剂量 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每 48 小时更换 1 次培养基。处理 2 周后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 洗涤 3 次, 用 0.2% 结晶紫染色 10 min, PBS 洗涤 3 次, 扫描各孔图像并分析。

2.4 ROS 水平检测

HepG2、Huh7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 按“2.3”项下方法进行分组和给药, 处理 24 h 后弃去培养基, 加入 1 mL 无血清细胞培养基稀释的 DCFH-DA, 培养箱孵育 20 min, 无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次, 收集细胞, 采用流式细胞仪进行检测。

2.5 脂质活性氧 (lipid reactive oxygen species, Lipid-ROS) 检测

HepG2、Huh7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 按“2.3”项下方法进行分组和给药, 处理 24 h 后各组细胞装载 C11-BODIPY 荧光探针, 培养箱孵育 1 h 后, 洗去多余的探针, 使用荧光显微镜观察并拍照。

2.6 Fe^{2+} 、GSH/GSSG、MDA 水平检测

HepG2、Huh7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 按“2.3”项下方法进行分组和给药, 处理 24 h 后收集细胞, 分别根据试剂盒方法进行的操作, 采用酶标仪测定 593、405 和 532 nm 处的 A 值, 计算 Fe^{2+} 、GSH/GSSG 和 MDA 含量。

2.7 线粒体微观形态观察

Huh7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 设置对照组 (不加药物) 和 Sch B (40 $\mu\text{mol/L}$) 组, 处理 24 h 后收集细胞, 加入 2.5% 戊二醛避光固定, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 加入 1% 锇酸避光固定, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 梯度脱水、包埋、浸泡, 最后将制作好的超薄切片样品进行电镜观察。

2.8 Western blotting 检测铁死亡相关蛋白表达

HepG2、Huh7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 按“2.3”项下方法进行分组和给药, 处理 24 h 后提取细胞总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 加入一抗, 4°C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 30 min, 在化学发光成像仪中成像, 使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 qRT-PCR 检测铁死亡相关基因的表达

HepG2、Huh7 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔

板,按“2.3”项下方法进行分组和给药,处理 24 h 后提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法评估各标本目的基因 mRNA 表达水平。引物序列: *GPX4* 上游引物 5'-TCAGCAAGA-TCTGCGTGAAC-3',下游引物 5'-ATAGTGGGGC-AGGTCCTTCT-3'; *ACSL4* 上游引物: 5'-TTGGCTA-CTTACCTTTGGCTCATGTG-3',下游引物 5'-TACA-ATCACCCTTGCTTCCCTTCTTG-3'; *SLC7A11* 上游引物 5'-GGCAGTGACCTTTTCTGAGC-3',下游引物 5'-ACAGCTGGTAGAGGAGTGTG-3'; *GAPDH* 上游引物 5'-TGTTGCCATCAACGACCCCTT-3',下游引物 5'-CTCCACGACATACTCAGCA-3'。

2.10 Sch B 的含量测定

2.10.1 色谱条件 Fortis XI C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水 (90:10),等度洗脱;柱温 30 °C;进样量 20 μL;体积流量 1 mL/min;检测波长 250 nm。

2.10.2 对照品溶液的制备 精密称取 Sch B 对照品 10.60 mg 至 50 mL 量瓶中,用甲醇定容,制成质量浓度为 212.00 μg/mL 的对照品溶液。

2.10.3 供试品溶液的制备 精密量取 Sch B-T-ME 适量,置于 50 mL 量瓶中,甲醇超声破乳溶解并定容,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得 Sch B-T-ME 供试品溶液。同法制备空白微乳 (T-ME) 对照溶液。

2.10.4 专属性考察 分别取 Sch B 对照品、Sch B-T-ME 供试品和 T-ME 对照溶液,按照“2.10.1”项下色谱条件进样测定,记录图谱。如图 1 所示, Sch B 的出峰时间约为 7.39 min,峰形良好, T-ME 对 Sch B 的出峰时间、含量测定无干扰,具有方法专属性。

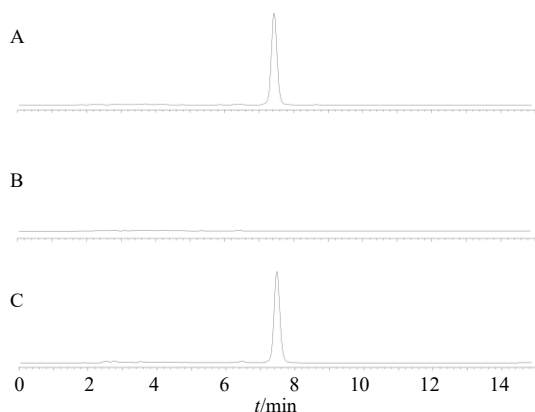


图 1 Sch B 对照品 (A)、T-ME 对照溶液 (B) 和 Sch B-T-ME 供试品溶液 (C) 的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of Sch B reference substance (A), T-ME control solution (B) and Sch B-T-ME test solution (C)

2.10.5 线性关系考察 取 Sch B 对照品储备液,配制成质量浓度分别为 1.66、3.31、6.63、13.25、26.50、53.00、106.00 和 212.00 μg/mL 的对照品溶液,按照“2.10.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以 Sch B 质量浓度 (X) 对其峰面积 (Y) 进行线性回归分析。拟合后得到的标准曲线方程为 $Y=38\,060 X-34\,230$,在质量浓度 1.66~212.00 μg/mL 具有良好的线性关系 ($R^2=0.999\,5$)。

2.10.6 精密度考察 精密吸取 Sch B 对照品溶液,按照“2.10.1”项下色谱条件进样测定,连续测定 6 次,记录峰面积并计算质量分数的 RSD 值,考察精密度。RSD 值为 1.5%,表明仪器精密度良好。

2.10.7 重复性考察 精密吸取供试品溶液 6 份,按“2.10.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算质量分数的 RSD 值,考察重复性。RSD 值为 1.67%,表明方法重复性良好。

2.10.8 加样回收率考察 精密吸取供试品溶液 6 份,分别加入等量的 Sch B 对照品,按“2.10.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率及 RSD 值,考察加样回收率。加样回收率为 99.87%,RSD 值为 1.03%,符合要求。因此该方法可用于 Sch B 体外样品含量的检测。

2.11 Sch B-T-ME 的制备

将过量的 Sch B 分别加入到不同的油相和助表面活性剂中,在 37 °C 下置于振荡器中平衡 48 h。10 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,按“2.10.1”项下色谱条件进样测定不同辅料中 Sch B 的含量。

根据 Sch B 在不同辅料中的溶解度,绘制 Sch B 的伪三元相图。通过将表面活性剂和助表面活性剂以 1:3、1:2、1:1、2:1 的质量比 (K_m) 均匀混合来获得表面活性剂混合物 (S_{mix})。将油酸与 S_{mix} 按质量比 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 的比例混匀,磁力搅拌下缓慢滴加蒸馏水,记录体系由澄清透明到浑浊时的加水量,根据油、水和 S_{mix} 在临界点处的质量百分比,绘制伪三元相图以确认 ME 区域^[24]。

采用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 设计响应面,以乳化剂混合物质量比 (A)、油相与乳化剂混合物质量比 (B)、水相质量百分比 (C) 3 个因素为响应因子,以粒径、聚合物分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 为考察指标,以综合评分 (R) 为响应值,将制得的微乳分别放入激光粒度仪中测量其粒径 (X) 和 PDI (Y),根据测得的数据通过 log 函数标准化法进

行标准化处理, 从而进行综合评分, 并利用 Design Expert 软件对评价结果进行分析。评分标准 $R = [(X_{\max} - X)/(X_{\max} - X_{\min})] \times 50\% + [Y_{\max} - Y]/Y_{\max} \times 50\%$ 。

在优化后的 T-ME 中加入 Sch B, 制成投药量分别为 1%、2%、3% 的微乳, 用纯水稀释 100 倍, 测定其平均粒径和 PDI。

2.12 Sch B-T-ME 的表征

通过粒径仪测定 Sch B-T-ME 的粒径、PDI 和 Zeta 电位。为了对 Sch B-T-ME 的形态进行成像, 用 2% 磷钨酸对铜网上的风干样品进行染色, 通过透射电镜观察 Sch B-T-ME 的形态。为了研究 Sch B-T-ME 的稳定性, 将样品密封室温储存 1 个月, 通过测定粒径、PDI、Zeta 电位和 Sch B 含量变化, 评价 Sch B-T-ME 的储存稳定性。

2.13 Sch B-T-ME 细胞毒性评价

取 HepG2、Huh7 和 L02 细胞以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 分别加入含有不同浓度 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 的游离 Sch B、T-ME 和 Sch B-T-ME, 处理 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值。

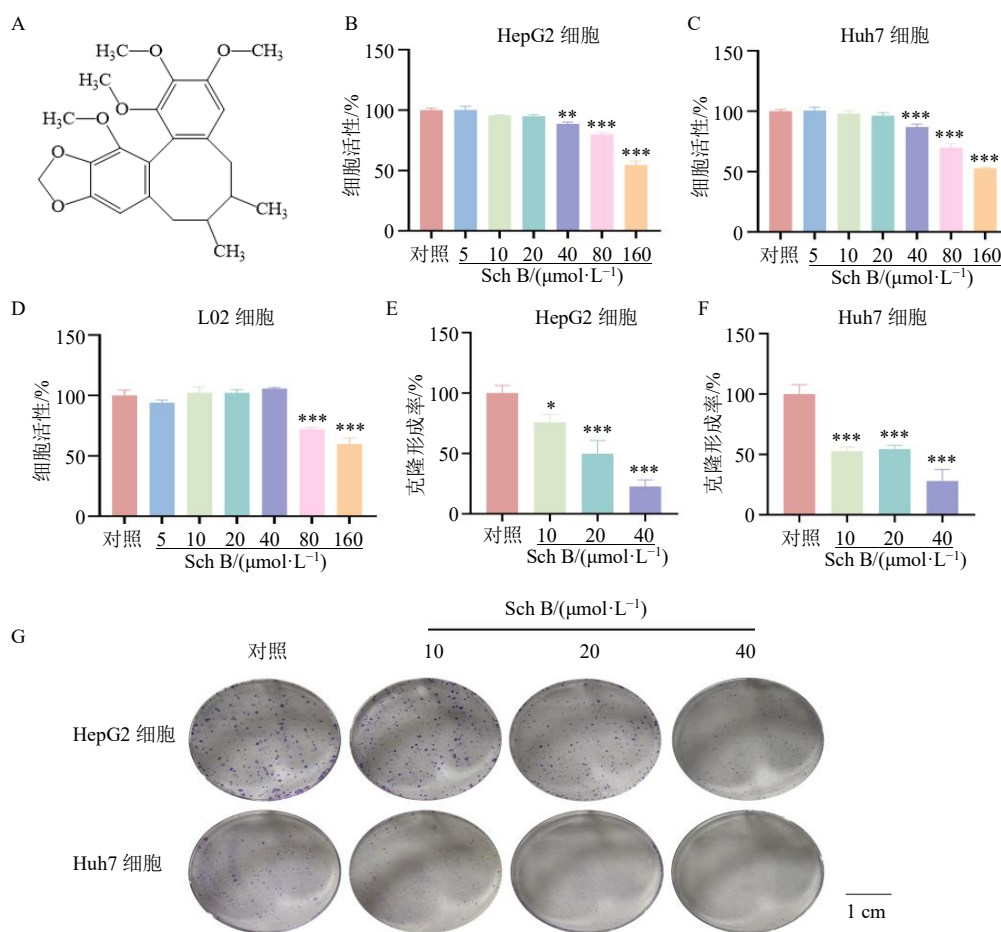
2.14 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 Sch B 对肝癌细胞增殖的影响

通过 CCK-8 实验和平板克隆实验观察 Sch B 对肝癌细胞增殖和克隆形成能力的影响。如图 2-B~D 所示, Sch B 呈剂量相关性地抑制 HepG2 和 Huh7



A-Sch B 化学结构式; B~D-Sch B 处理 24 h 后检测 HepG2、Huh7 和 L02 细胞活力; E、F-Sch B 处理 2 周后检测 HepG2 和 Huh7 细胞的克隆形成率; G-Sch B 处理 2 周后细胞集落的代表性图像; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

A-chemical structure of Sch B; B~D-viability of HepG2, Huh7 and L02 cells after 24 h of treatment with Sch B; E, F-colony formation rate of HepG2 and Huh7 cells after two weeks of treatment with Sch B; G-representative images of cell colonies after two weeks of treatment with Sch B; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

图 2 Sch B 抑制肝癌细胞的增殖和克隆形成能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Sch B inhibits viability and colony formation ability of hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞的增殖, Sch B (40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 显著抑制肝癌细胞活性 ($P < 0.01$ 、0.001), Sch B (80、160 $\mu\text{mol/L}$) 显著抑制人正常肝细胞 L02 细胞活性 ($P < 0.001$)。因此选择 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Sch B 进行后续实验。如图 2-E~G 所示, 与对照组比较, 给予 Sch B 后 HepG2 和 Huh7 细胞的克隆形成率显著下降 ($P < 0.05$ 、0.001), 表明 Sch B 能够抑制肝癌细胞的集落形成能力, 即抑制肝癌细胞增殖。

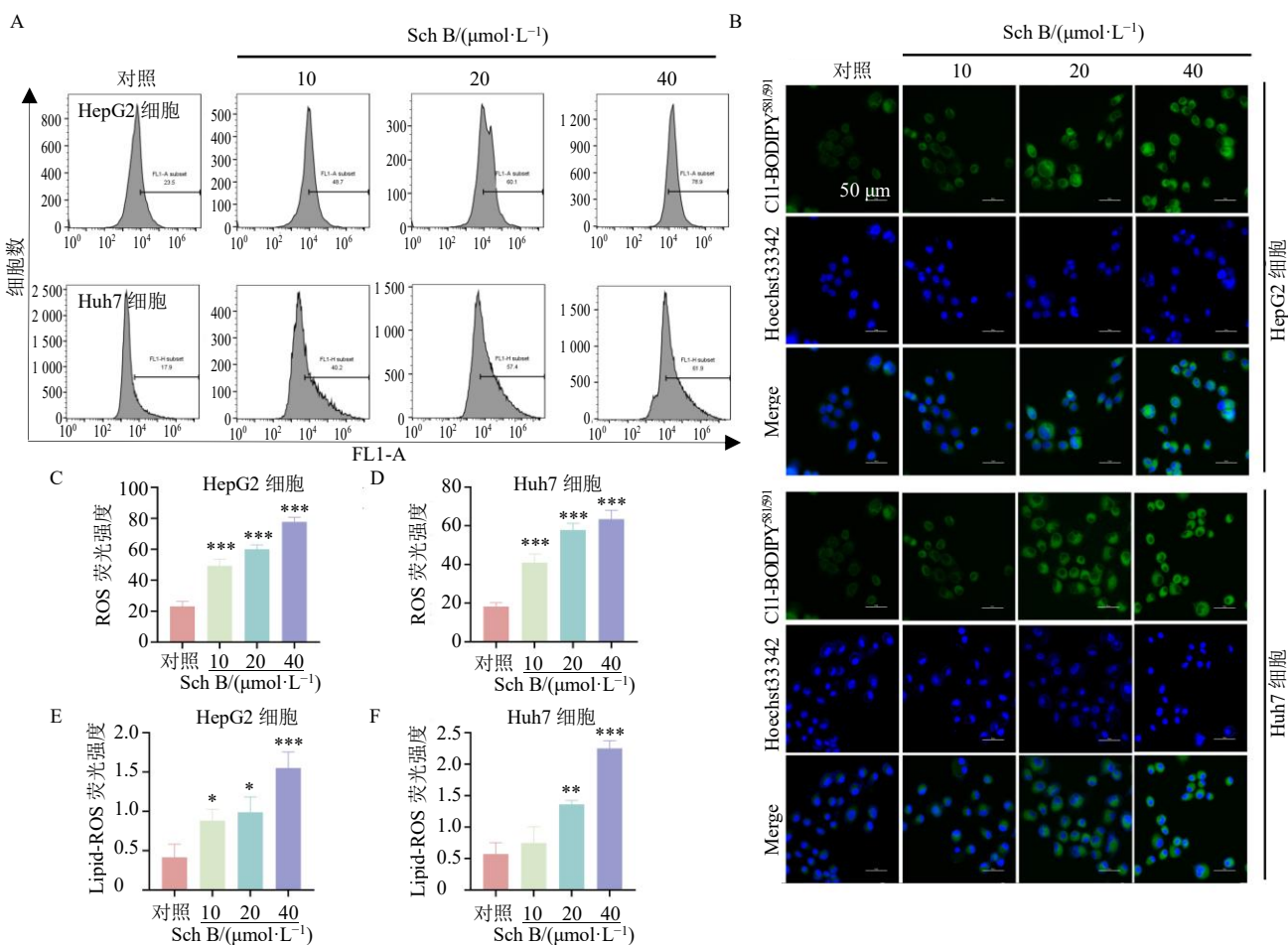
3.2 Sch B 促进肝癌细胞氧化产物的积累

使用荧光探针 DCFH-DA 和 C11-BODIPY^{581/591} 对肝癌细胞进行 ROS 和 Lipid-ROS 检测。如图 3-A、C、D 所示, 与对照组比较, 给予 Sch B 后 HepG2、Huh7 细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.001$), 表明 Sch B 能呈剂量相关性地刺激肝癌细胞产生 ROS。用 C11-BODIPY^{581/591} 染色评估肝癌细胞脂质过氧化的水平, 如图 3-B、E、F 所示, 给予 Sch B 后,

HepG2、Huh7 细胞内 Lipid-ROS 荧光强度显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明 Sch B 可以诱导肝癌细胞发生脂质过氧化反应。

3.3 Sch B 对肝癌细胞 Fe^{2+} 、MDA、GSH 含量及线粒体形态的影响

如图 4-A、D 所示, Sch B 呈剂量相关性地增加了 HepG2 和 Huh7 细胞中 Fe^{2+} 含量 ($P < 0.01$ 、0.001)。此外, 随着 Sch B 浓度的升高, HepG2 和 Huh7 细胞内 GSH/GSSG 水平降低 ($P < 0.05$ 、0.01), MDA 含量升高 ($P < 0.05$ 、0.001)。如图 4-G 所示, 对照组 Huh7 细胞线粒体形态结构正常, 而 Sch B 处理后 Huh7 细胞线粒体出现了膜破裂、数量减少、嵴数量减少等典型的铁死亡形态学特征。以上结果表明, Sch B 可引起肝癌细胞中 Fe^{2+} 蓄积, 抗氧化系统失衡, 脂质过氧化产物堆积, 从而诱导细胞发生铁死亡, 线粒体形态的变化也证实了这一点。

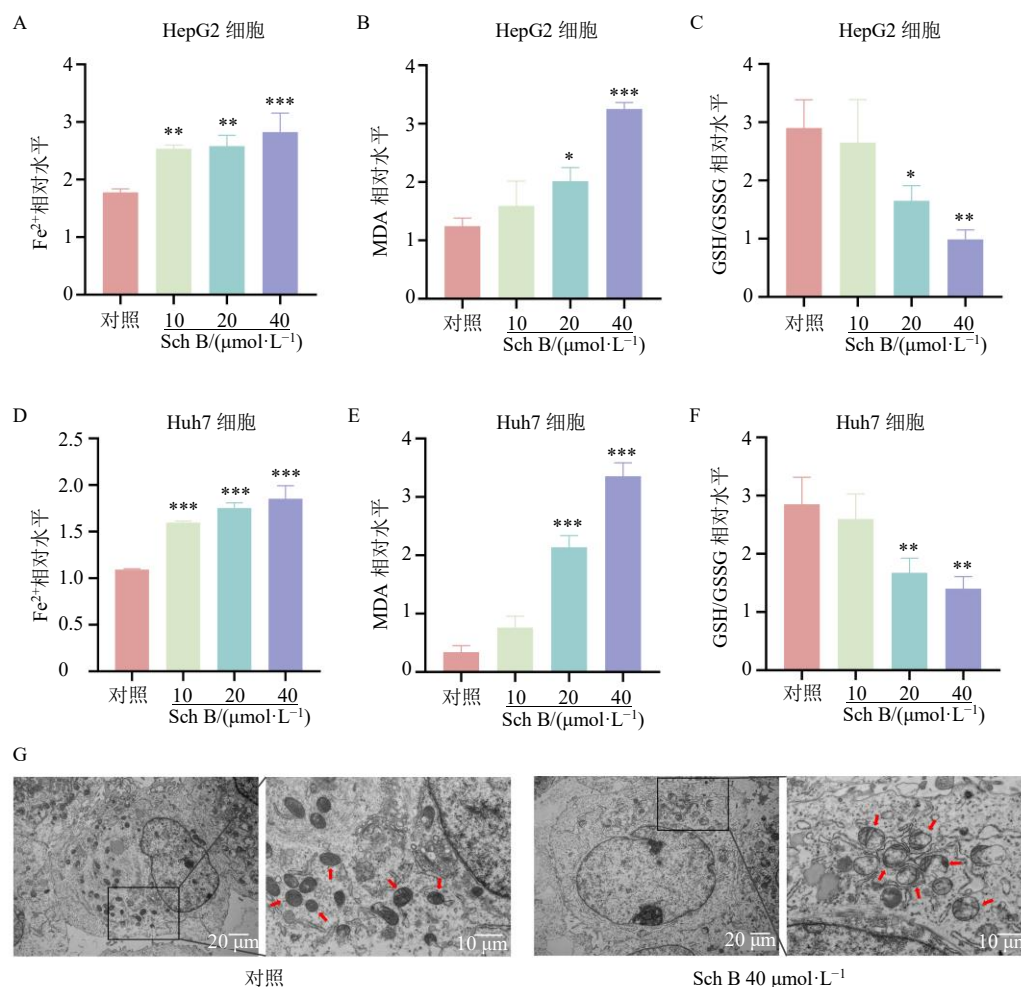


A、C、D-Sch B 对 HepG2 和 Huh7 细胞 ROS 水平的影响; B、E、F-Sch B 对 HepG2 和 Huh7 细胞 Lipid-ROS 水平的影响 ($\times 200$)。

A, C, D-effect of Sch B on ROS level in HepG2 and Huh7 cells; B, E, F-effect of Sch B on lipid ROS level in HepG2 and Huh7 cells ($\times 200$).

图 3 Sch B 促进肝癌细胞氧化产物的积累 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Sch B promotes accumulation of oxidation products in hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A~C-Sch B 对 HepG2 细胞 Fe^{2+} 、MDA、GSH 含量的影响；D~F-Sch B 对 Huh7 细胞 Fe^{2+} 、MDA、GSH 含量的影响；G-Sch B 对 Huh7 细胞线粒体形态的影响 ($\times 5\,000$, $\times 15\,000$), 箭头代表线粒体。

A—C-effect of Sch B on Fe^{2+} , MDA and GSH levels in HepG2 cells; D—F-effect of Sch B on Fe^{2+} , MDA and GSH levels in Huh7 cells; G-effect of Sch B on mitochondrial morphology in Huh7 cells ($\times 5\,000$, $\times 15\,000$), arrows indicate mitochondria.

图 4 Sch B 对肝癌细胞 Fe^{2+} 、MDA、GSH 含量与线粒体形态的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of Sch B on Fe^{2+} , MDA, and GSH levels and mitochondrial morphology in hepatocellular carcinoma cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 Sch B 通过调节肝癌细胞中 SLC7A11、GPX4 和 ACSL4 的表达来促进铁死亡

采用 Western blotting 和 qRT-PCR 检测 Sch B 对肝癌细胞铁死亡过程相关的蛋白和 mRNA 表达的变化。如图 5、6 所示，与对照组比较，给予 Sch B 后 HepG2 和 Huh7 细胞中 GPX4 与 SLC7A11 蛋白表达下调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，ACSL4 蛋白表达水平上调 ($P < 0.01$ 、 0.001)，且呈剂量相关性。qRT-PCR 的结果与用 Western blotting 结果一致。SLC7A11、GPX4 及 ACSL4 为铁死亡相关蛋白，表明 Sch B 可调控铁死亡通路相关分子的表达从而激活铁死亡。

3.5 Sch B-T-ME 的制备

TPGS 是一种被 FDA 批准作为安全的佐剂，具有包含亲水性极性头部和亲脂性烷基基部的两亲性结构^[25]。此外，TPGS 能抑制 ATP 依赖性 P-糖蛋白的活性，是克服肿瘤多药耐药的有效辅料^[26]。本研究采用 TPGS 为乳化剂。载药能力是设计微乳处方时的重要考量因素。Sch B 在各组分中的溶解度见图 7-a，由于醋酸乙酯毒性较大，高浓度时对人的眼、鼻、呼吸道等具有刺激性作用^[27]，故选择油酸作油相。虽然 Sch B 在 PEG400 中的溶解度略大于无水乙醇，但 TPGS 无法溶解于 PEG400，最终选定无水乙醇作助乳化剂。采用伪三元相图对微乳的组

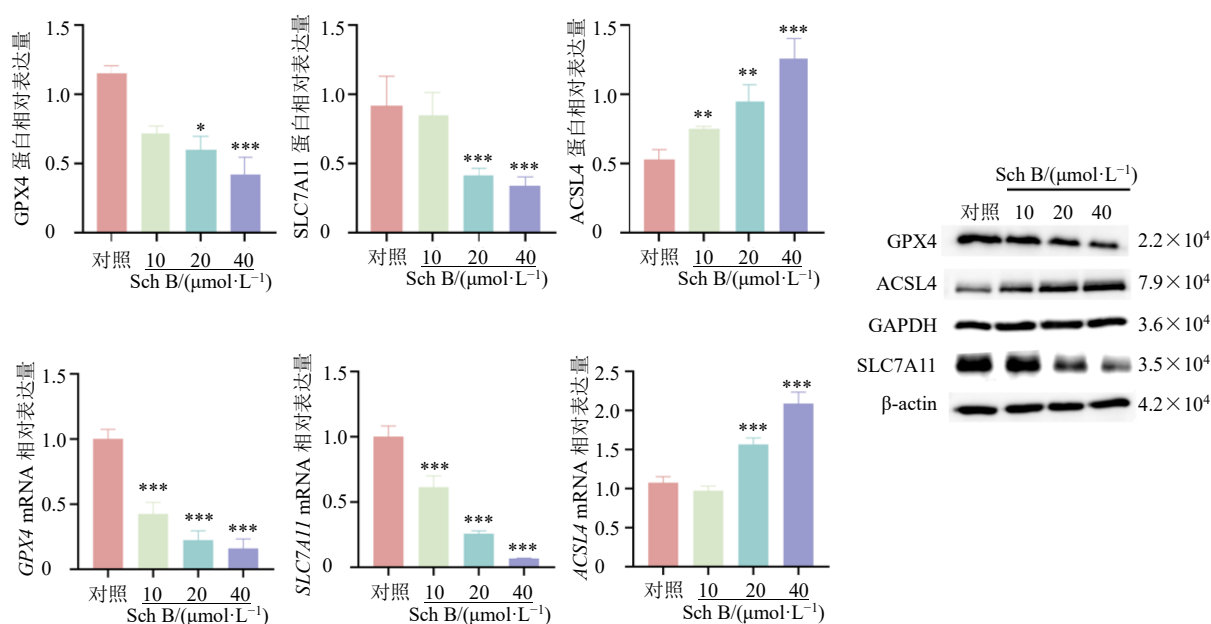


图 5 Sch B 对 HepG2 细胞 GPX4、SLC7A11、ACSL4 蛋白和 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Sch B on protein and mRNA expressions of GPX4, SLC7A11 and ACSL4 in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

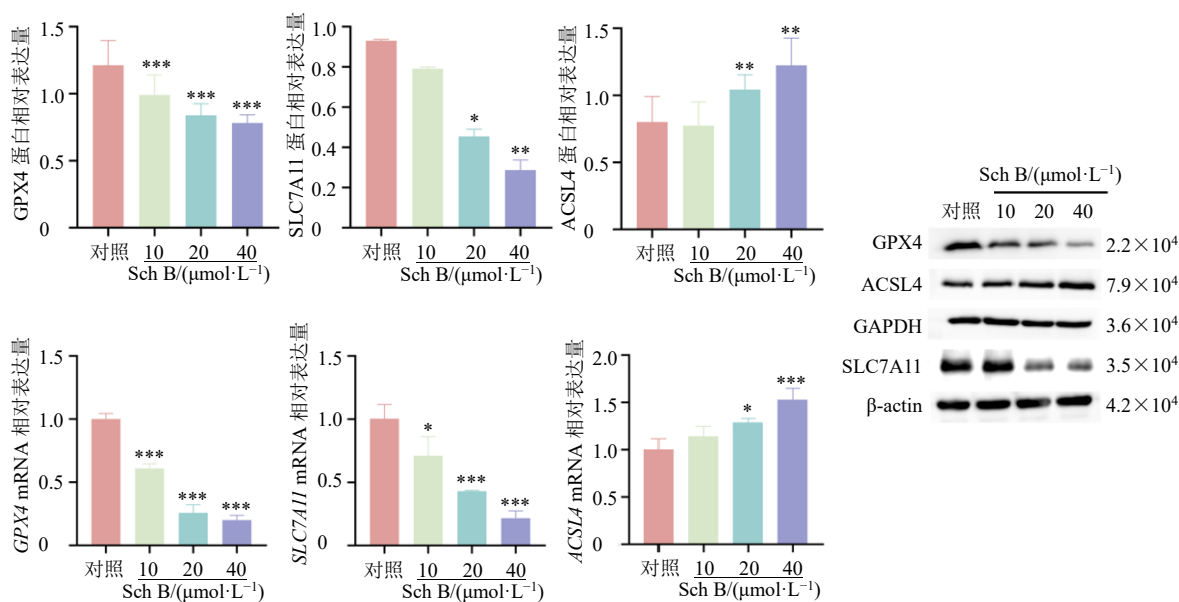
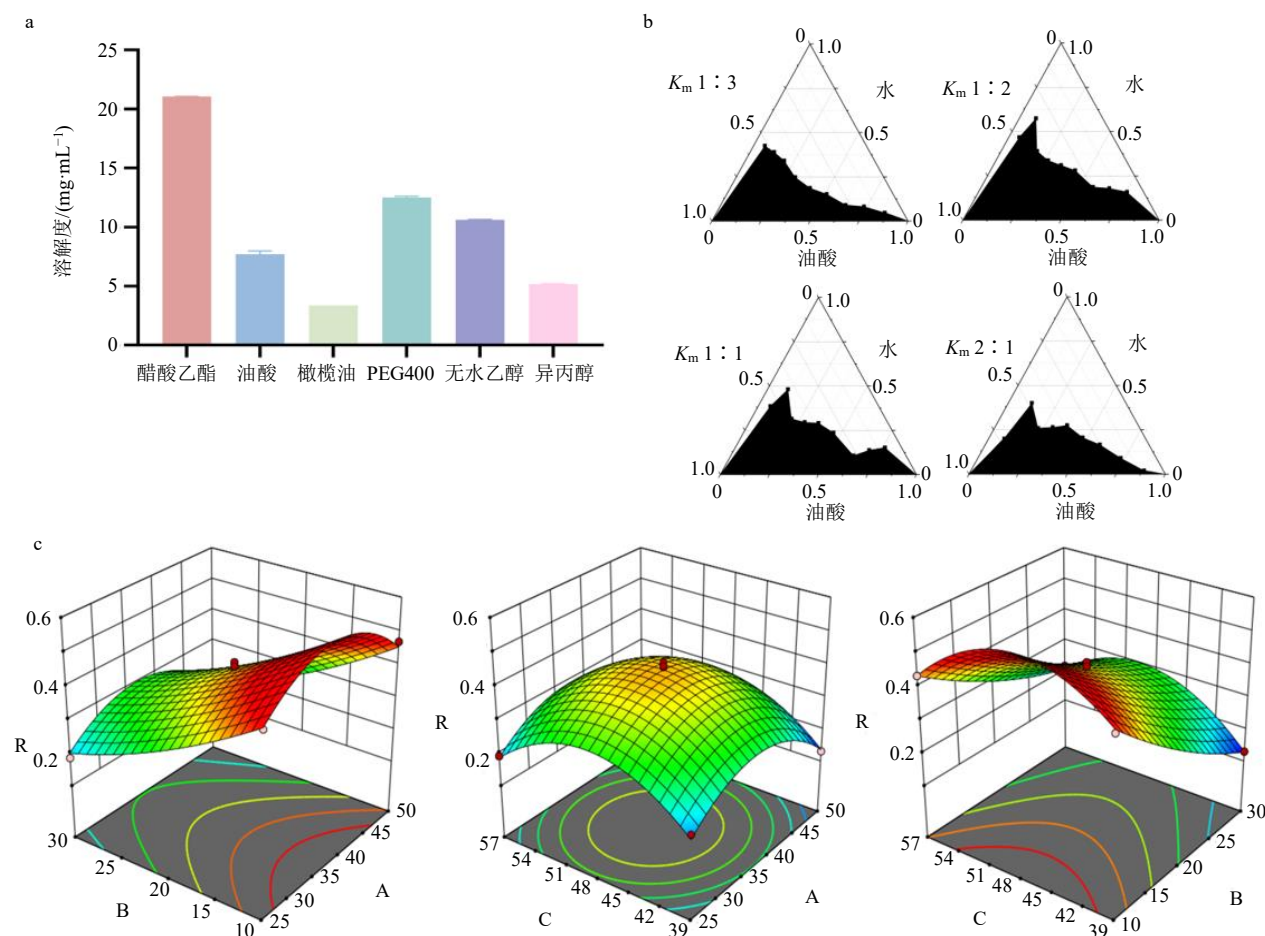


图 6 Sch B 对 Huh7 细胞 GPX4、SLC7A11、ACSL4 蛋白和 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Sch B on protein and mRNA expressions of GPX4, SLC7A11 and ACSL4 in Huh7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

成相进行了优化 (图 7-b), 微乳区域面积越大, 说明微乳处方越稳定, 最终确定 K_m 为 1:2。采用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 设计, 以粒径和 PDI 为评价指标, 对方剂进行优化 (表 1、图 7-c)。响应面法拟合方程为 $R = 4180 - 0.0173A - 0.1440B + 0.0080C - 0.0028AB + 0.0018AC + 0.0307BC +$

$0.1209A^2 + 0.0281B^2 + 0.1339C^2$, 拟合系数 $R^2 = 0.9901$, 该模型经检验 $P < 0.05$, 具有显著性差异, 提示模型与实际情况吻合度较高。失拟项经检验 $P > 0.05$, 不具有显著性差异, 提示拟合结果良好, 模型可信度较高, 可以进行相应拟合模拟。根据拟合结果确定出的最佳处方为油酸: 水: TPGS: 无水乙



a-Sch B 在不同辅料中的溶解度；b-伪三元相图；c-Box-Behnken 设计（A 为乳化剂混合物质量比，B 为油相与乳化剂混合物质量比，C 为水相质量百分比）。

a-solubility of Sch B in various excipients; b-pseudoternary phase diagram; c-Box-Behnken design (A is mass ratio of emulsifier mixture, B is mass ratio of oil phase to emulsifier mixture, C is mass percentage of aqueous phase).

图 7 T-ME 的处方优化

Fig. 7 T-ME prescription optimization

表 1 Box-Behnken 设计因素与水平

Table 1 Box-Behnken design factors and levels

因素	水平		
	-1	0	+1
A	1 : 3	1 : 2	1 : 1
B	1 : 9	2 : 8	3 : 7
C/%	39	48	57

A-乳化剂混合物质量比；B-油相与乳化剂混合物质量比；C-水相质量百分比。

A-mass ratio of emulsifier mixture; B-mass ratio of oil phase to emulsifier mixture; C-mass percentage of aqueous phase.

表 2 投药量对微乳粒径大小的影响 ($n = 3$)

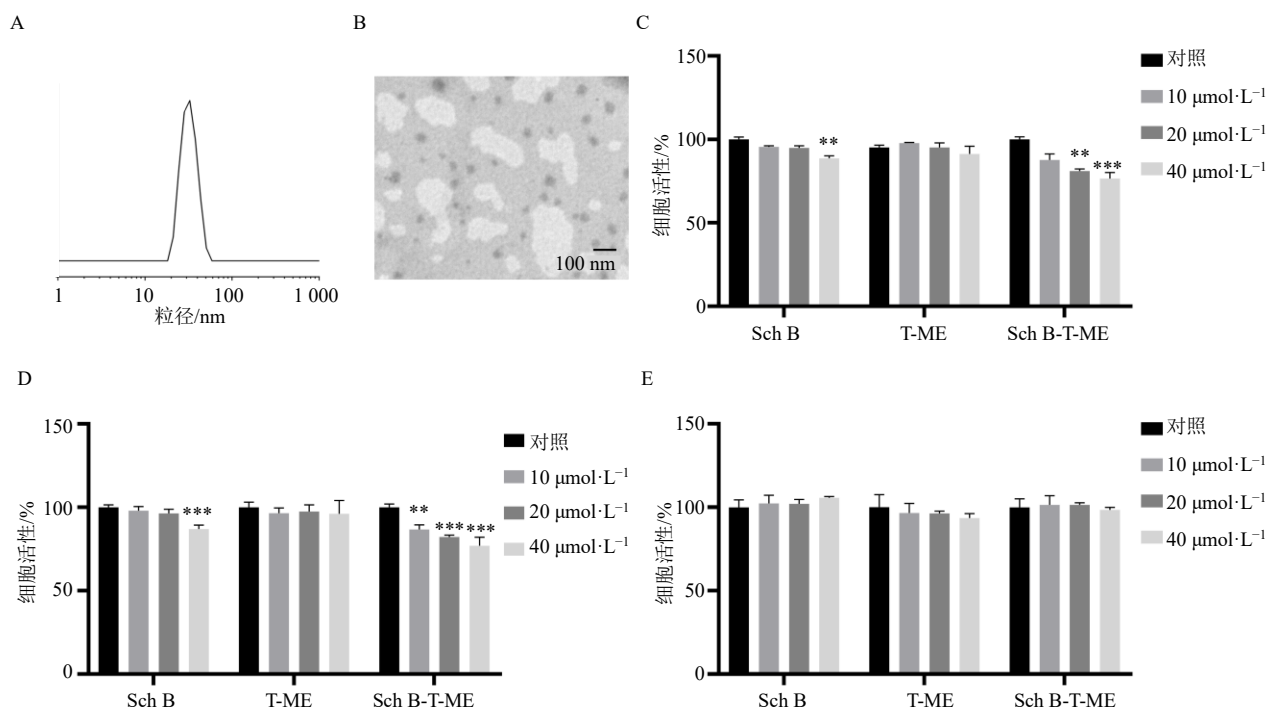
Table 2 Effect of dosage on microemulsion particle size

$(n = 3)$		
投药量/%	粒径/nm	PDI
1	31.51 ± 2.12	0.278 ± 0.016
2	33.19 ± 4.46	0.269 ± 0.026
3	112.03 ± 3.45	0.425 ± 0.023

醇=5.28 : 47.48 : 17.46 : 30.02。由表 2 可见，投药量在 1%~2%时粒径与 PDI 无显著变化，而当投药量达到 3%时，振荡可见明显颗粒，PDI 变大，粒径大于 100 nm，不符合微乳的结构，因此确定投药量为 2%。

3.6 Sch B-T-ME 微乳的表征

如图 8-A、B 所示，Sch B-T-ME 分散均匀，粒径较小。经测定 Sch B-T-ME 的平均粒径为 (38.29 ± 1.97) nm，Zeta 电位为 (-4.73 ± 0.36) mV，PDI 为 0.266 ± 0.011 。微乳的粒径是评价微乳性能的关键指标，粒径越小，释放较快^[28]。由表 3 可知 Sch B-T-ME 在不同的时间下 Zeta 电位、PDI、粒径分布及药物含量无明显差异，Sch B-T-ME 稳定性良好。



A-Sch B-T-ME 的粒径; B-Sch B-T-ME 的微观形态 ($\times 20\,000$); C~E-Sch B-T-ME 对 HepG2、Huh7 和 L02 细胞活性的影响。
A-particle size of Sch B-T-ME; B-micromorphology of Sch B-T-ME ($\times 20\,000$); C~E-effect of Sch B-T-ME on viability of HepG2, Huh7 and L02 cells.

图 8 Sch B-T-ME 的特征与对细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Characterisation of Sch B-T-ME and its effect on cell activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 Sch B-T-ME 的储存稳定性 ($n = 3$)

Table 3 Storage stability of Sch B-T-ME ($n = 3$)

t/d	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	药物含量/(mg·mL ⁻¹)
0	34.99 ± 2.14	0.271 ± 0.006	-4.70 ± 0.50	1.985 ± 0.004
5	38.55 ± 1.46	0.267 ± 0.016	-4.85 ± 0.33	1.944 ± 0.002
10	38.29 ± 1.97	0.266 ± 0.011	-4.73 ± 0.36	1.852 ± 0.006
20	36.90 ± 0.39	0.238 ± 0.031	-4.63 ± 0.46	1.874 ± 0.002
30	39.77 ± 1.09	0.273 ± 0.014	-4.68 ± 0.32	1.842 ± 0.008

3.7 Sch B-T-ME 增强 Sch B 抗肝癌活性

如图 8-C~E 所示, T-ME 对 HepG2、Huh7 和 L02 细胞的活性无明显影响, 表明 T-ME 具有较低的毒性和一定的生物安全性。此外, Sch B-T-ME 对 HepG2 和 Huh7 细胞显示出显著的抑制作用 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而 Sch B-T-ME 对 L02 细胞活力无明显影响, 表明 Sch B-T-ME 抗肝癌效果优于 Sch B, 可能是由于 Sch B 溶解度的提高以及 Sch B-T-ME 纳米粒子被细胞的主动摄取。

4 讨论

在本研究中, CCK-8 和克隆形成实验表明, Sch B 呈剂量相关性地抑制 HepG2 和 Huh7 细胞的增殖, 铁死亡可能是其发挥抗肝癌作用的机制。本研究制备的 Sch B-T-ME 对 L02 细胞无影响, 但增强了 Sch B 对 HepG2 和 Huh7 细胞活力的抑制。

铁死亡是一类特殊的细胞死亡形式, 与其他细胞死亡方式有本质的差别, 目前被证实在肝癌发展中起着非常重要的作用。在形态学上, 铁死亡主要表现为线粒体缩小、双层膜密度明显增厚以及内膜嵴缺失^[29]。本研究发现, 经 Sch B 处理后, 肝癌细胞发生了典型的铁死亡形态学改变。在生化特征上, 铁死亡主要表现为: (1) Fe^{2+} 的积累; (2) 胱氨酸的摄入减少, GSH 的耗竭, GPX4 的活性降低, 还原型辅酶 II 的氧化反应增加; (3) 丝裂原活化蛋白激酶的活性被激活^[30]。本研究表明, Sch B 可以促进肝癌细胞 Fe^{2+} 的积累, 使细胞对铁死亡的敏感性增加。Sch B 降低了肝癌细胞 GSH 的含量, GSH 的消耗会破坏细胞氧化还原稳态, 使 ROS 和 Lipid-ROS 大量产生, 导致细胞死亡。此外, ROS 积累作用于脂质发生一系列过氧化反应, 使得脂质过氧化产物

MDA 积累。

在遗传学上,铁死亡受多个基因调控,包括铁代谢失常、脂质过氧化物及其代谢物蓄积、GPX4 生成受阻、氨基酸和谷胱甘肽代谢失衡等^[31]。SLC7A11 主导胱氨酸和谷氨酸的交换,胱氨酸产生半胱氨酸,半胱氨酸是促进 GSH 合成的重要底物^[32]。GSH 是 GPX4 的重要辅助因子,维持 GPX4 的活性和表达。一旦 System Xc-/GSH/GPX4 轴的功能被抑制或不稳定,就会导致铁死亡的发生^[33]。导致细胞发生铁死亡的另一个关键因素是脂质过氧化产物的铁依赖性积累以及磷脂多不饱和脂肪酸的耗竭,ACSL4 通过参与合成一些易被氧化的膜磷脂而成为引发铁死亡的必需组分之一^[34]。本研究证实了 Sch B 诱导抗铁死亡系统 System Xc-核心分子 GPX4、SLC7A11 蛋白和 mRNA 表达水平的下调,使 HepG2 和 Huh7 细胞内脂质过氧化物代谢障碍,抑制细胞内的还原系统,同时诱导脂质过氧化底物 ACSL4 蛋白和 mRNA 表达水平的上调,使得细胞堆积大量脂质过氧化物从而促进铁死亡的发生。

微乳是一种由油相、水相、乳化剂和助乳化剂组成,粒径为 1~100 nm 的热力学稳定体系,具有生物利用度高、载药效率高、稳定性好、药物分散率高、制备方便等多种优点,是一种良好的药物载体^[35]。TPGS 可以靶向癌细胞的线粒体,导致线粒体不稳定,从而激活线粒体凋亡介质^[36],此外,TPGS 可以选择性地诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常细胞和组织无毒性^[37]。因此本研究以 TPGS 为乳化剂制备 Sch B-T-ME。结果表明 Sch B-T-ME 平均粒径为 (38.29 ± 1.97) nm, Zeta 电位为 (-4.73 ± 0.36) mV, PDI 为 0.266 ± 0.011 , 储存稳定性良好。Zeta 电位作为液滴之间相互吸引或排斥强度的度量, Zeta 电位相对值越高,体系越稳定。反之, Zeta 电位相对值越低,越倾向于凝结或凝聚^[38]。通常,纳米颗粒的 Zeta 电位绝对值大于 25 mV 更有利于维持体系的稳定性,而本研究中 Sch B-T-ME 的 Zeta 电位为 (-4.73 ± 0.36) mV,可能是由于 TPGS 为非离子型表面活性剂,电离及离子吸附能力弱^[39], Zeta 电位过低会使粒子发生部分聚集,但微乳进入体内后会在胃肠道内迅速乳化并被小肠吸收,不会发生药物的聚集析出。CCK-8 实验证实了 T-ME 对 HepG2、Huh7、L02 细胞的活力无影响,对比游离的 Sch B, Sch B-T-ME 极大地降低了 HepG2 和 Huh7 细胞的活力,而对 L02 细胞无影响,证明了 Sch B-

T-ME 能够选择性地诱导肝癌细胞死亡。

综上,本研究发现 Sch B 能通过铁死亡途径发挥抑制肝癌细胞增殖的作用,通过诱导 HepG2 和 Huh7 细胞抗铁死亡系统 System Xc-下调,促进细胞内 Fe^{2+} 和脂质过氧化代谢产物的过度积累,导致细胞死亡。同时成功制备了 Sch B-T-ME,证明其增强了 Sch B 抑制肝癌细胞增殖的效果,说明 Sch B-T-ME 是一种有前景的抗肝癌药物制剂,在肝癌治疗中具有潜在价值,为 Sch B 开发为肝癌治疗药物及适宜剂型奠定了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Donne R, Lujambio A. The liver cancer immune microenvironment: Therapeutic implications for hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1773-1796.
- [2] Rungay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [3] Yegin E G, Oymaci E, Karatay E, et al. Progress in surgical and nonsurgical approaches for hepatocellular carcinoma treatment [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2016, 15(3): 234-256.
- [4] 贾丽君, 单煜, 戴伟, 等. 参芪五味子颗粒对肝癌荷瘤小鼠免疫抑制调节的影响 [J]. *右江医学*, 2022, 50(9): 647-652.
- [5] 刘皎皎, 杨跃青, 戴玲, 等. 肝癌患者联合应用地五养肝胶囊与吉西他滨化疗对血清 PDGF 水平及生存情况的影响 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2019, 27(11): 811-814.
- [6] 孙振, 李书, 程彬彬, 等. 软坚护肝片含药血清对肝癌细胞迁移侵袭作用及机制 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(3): 22-25.
- [7] 俞赞丰, 杨欣雨, 韦方敏, 等. 基于《古今名医临证金鉴》的历代名医论治胸痹心痛的用药规律研究 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(9): 100-105.
- [8] Zhou Q, Meng Y, Li D S, et al. Ferroptosis in cancer: From molecular mechanisms to therapeutic strategies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 55.
- [9] Chang C M, Liang T R, Lam H Y P. The use of schisandrin B to combat triple-negative breast cancers by inhibiting NLRP3-induced interleukin- 1β production [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(1): 74.
- [10] Wang Y P, Chen J, Huang Y R, et al. Schisandrin B suppresses osteosarcoma lung metastasis *in vivo* by inhibiting the activation of the Wnt/ β -catenin and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2022, 47(3): 50.
- [11] Song A P, Ding T T, Wei N, et al. Schisandrin B induces HepG2 cells pyroptosis by activating NK cells mediated anti-tumor immunity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023, 472: 116574.

- [12] Li S P, Wang H, Ma R D, *et al.* Schisandrin B inhibits epithelial-mesenchymal transition and stemness of large-cell lung cancer cells and tumorigenesis in xenografts via inhibiting the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(6): 115.
- [13] He L Y, Chen H, Qi Q Q, *et al.* Schisandrin B suppresses gastric cancer cell growth and enhances the efficacy of chemotherapy drug 5-FU *in vitro* and *in vivo* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 920: 174823.
- [14] 刘媛媛, 黄仕其, 李玉泽, 等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1903-1918.
- [15] 张玲玲, 王漂, 房艳华, 等. 五味子乙素器官保护作用的分子机制研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(4): 896-900.
- [16] Nasser M I, Zhu S J, Chen C, *et al.* A comprehensive review on schisandrin B and its biological properties [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 2172740.
- [17] Jiang X R, Li H D, Liu Y. Cyclovirobuxine D inhibits hepatocellular carcinoma growth by inducing ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 96.
- [18] Ma J L, Zhang W, Li J J, *et al.* EXPRESS: A new therapeutic perspective: Erastin inhibits tumor progression by driving ferroptosis in myelodysplastic syndromes [J]. *J Invest Med*, 2024: 10815589241246541.
- [19] Khan A, Huo Y, Guo Y L, *et al.* Ferroptosis is an effective strategy for cancer therapy [J]. *Med Oncol*, 2024, 41(5): 124.
- [20] 阚默, 宋凤媛, 史建琨, 等. 五味子乙素聚合物胶束的制备及包封率的测定 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(11): 2659-2661.
- [21] 闫飞, 施江培, 陈海珍, 等. 载五味子乙素 F127 修饰脂质聚合物纳米粒抑制乳腺癌肺转移的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(21): 5177-5183.
- [22] Liu Y, Guerrero D Q, Lechuga-Ballesteros D, *et al.* Lipid-based self-microemulsion of niclosamide achieved enhanced oral delivery and anti-tumor efficacy in orthotopic patient-derived xenograft of hepatocellular carcinoma in mice [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 2639-2653.
- [23] Zeng H T, Li X Q, Liu Y P, *et al.* An icaritin-loaded microemulsion based on coix oil for improved pharmacokinetics and enhanced antitumor efficacy [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 3454-3466.
- [24] Yang X, Li W Q, Li S Z, *et al.* Fish oil-based microemulsion can efficiently deliver oral peptide blocking PD-1/PD-L1 and simultaneously induce ferroptosis for cancer immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2024, 365: 654-667.
- [25] Yang C L, Wu T T, Qi Y, *et al.* Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery [J]. *Theranostics*, 2018, 8(2): 464-485.
- [26] Wan T, Pan J T, Long Y M, *et al.* Dual roles of TPGS based microemulsion for tacrolimus: Enhancing the percutaneous delivery and anti-psoriatic efficacy [J]. *Int J Pharm*, 2017, 528(1/2): 511-523.
- [27] 周亚楠, 郑舒怡, 柳嘉雯, 等. 植物酵素代谢产物形成机制研究进展 [J/OL]. *食品工业科技*, (2024-01-08) [2024-04-18]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080203>.
- [28] Truong D H, Tran T H, Ramasamy T, *et al.* Development of solid self-emulsifying formulation for improving the oral bioavailability of erlotinib [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17(2): 466-473.
- [29] Dixit A R, Rajput S J, Patel S G. Preparation and bioavailability assessment of SMEDDS containing valsartan [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(1): 314-321.
- [30] He B S, Hu Y B, Cao Q, *et al.* Progression of unfolded protein response and ferroptosis in angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116354.
- [31] Lei G, Zhuang L, Gan B Y. The roles of ferroptosis in cancer: Tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(4): 513-534.
- [32] 李畅, 王浩, 贺千羽, 等. 槲皮素通过诱导铁死亡抑制 A549 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7112-7120.
- [33] 刘灿, 马武开, 陈昌明, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 System Xc-/GSH/GPX4 铁死亡通路的表达及其对炎症因子分泌的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(1): 64-70.
- [34] Murphy C S, DeMambro V E, Fadel S, *et al.* Inhibition of acyl-CoA synthetase long chain isozymes decreases multiple myeloma cell proliferation and causes mitochondrial dysfunction [J]. *bioRxiv*, 2024, doi: 10.1101/2024.03.13.583708.
- [35] do Nascimento J R, de Matos Monteiro Lira B S, do Nascimento M O, *et al.* Innovative microemulsion loaded with unusual dimeric flavonoids from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann roots [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2023, 24(8): 212.
- [36] Neuzil J, Dong L F, Ramanathapuram L, *et al.* Vitamin E analogues as a novel group of mitocans: Anti-cancer agents that act by targeting mitochondria [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(5/6): 607-645.
- [37] Neuzil J, Tomasetti M, Mellick A S, *et al.* Vitamin E analogues: A new class of inducers of apoptosis with selective anti-cancer effects [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(4): 355-372.
- [38] de Souza T C, Costa A F S, Vinhas G M, *et al.* Synthesis of iron oxides and influence on final sizes and distribution in bacterial cellulose applications [J]. *Polymers*, 2023, 15(15): 3284.
- [39] Buya A B, Belouqui A, Memvanga P B, *et al.* Self-nano-emulsifying drug-delivery systems: From the development to the current applications and challenges in oral drug delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(12): 1194.