网络出版时间:2025-03-26 10:38:46 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250325.1728.004

Erastin 和 RSL3 诱导肝癌铁死亡体外模型的构建

朱欣悦[1],任俏慧[1],臧 艳[1],周心怡[1],姚骏骁[1],王莲子[1],沙旭栋[2],李 涛[1]
([1]安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022;
[2]上海交通大学医学院药理学与化学生物学系,上海 200025)

摘要 **目的** 运用浓度倍增的铁死亡诱导剂 Erastin 和 RAS 选择性致死分子 3(RSL3)体外诱导肝癌细胞,并构建体外肝癌铁死亡模型,为开发针对肝癌的新型治疗策略提供理论依据。**方法** 以浓度倍增的 Erastin(0~40 μmol/L)和 RSL3(0~10 μmol/L)分别干预对数生长期肝癌细胞(HCCLM3、HepG2、Hep3B、Huh7 和 PLC/PRF/5),24 h 后运用 CCK-8 法检测细胞活力,绘制生长曲线,计算半抑制浓度(IC_{50}),选择对诱导剂敏感的肝癌细胞进行后续实验。光镜下观察诱导剂对细胞状态的影响;通过免疫印迹技术和流式细胞术验证体外铁死亡模型是否构建成功。**结果** 在 5 种肝癌细胞中,Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞对铁死亡诱导剂 Erastin 和 RSL3 较为敏感,HCCLM3 和 PLC/PRF/5 对 Erastin 和 RSL3 不敏感,当 Erastin 和 RSL3 的浓度达最大时,存活率仍有 65%以上。因此,选择 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞用于后续实验。分别按照 Erastin 和 RSL3 浓度梯度干预肝癌细胞,与对照组比较,铁死亡标志分子谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)表达量随着 Erastin 和 RSL3 的浓度依赖性下调。在 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞中,分别用 10 μmol/L 和 20 μmol/L Erastin 作用 24 h 后脂质活性氧(ROS)水平与对照组比较,显著增加;在 Huh7 细胞中,分别用 0.5 μmol/L 和 1 μmol/L RSL3 作用 24 h 后的脂质 ROS 水平与对照组比较,显著增加;在 Hep3B 和 HepG2 细胞中,分别用 1 μmol/L 和 2 μmol/L RSL3 作用 24 h 后的脂质 ROS 水平与对照组比较,显著增加。**结论** Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞对 Erastin 和 RSL3 敏感性高。10 μmol/L Erastin 作用 24 h 处理 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞是体外模拟 Erastin 诱导肝癌铁死亡的良好模型;0.5 μmol/L RSL3 作用 24 h 处理 Huh7 细胞以及 1 μmol/L RSL3 作用 24 h 处理 Hep3B 和 HepG2 细胞是体外模拟 RSL3 诱导肝癌铁死亡的良好模型。

关键词 肝癌;Erastin;RSL3;铁死亡;体外模型
中图分类号 R 735.7
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0611-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.004

原发性肝癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占 90%以上,病死率约为 8.3%,5 年生存率仅为 18%[1-2]。因其高发病率和治疗难度,对人类健康构成严重威胁。治疗方法主要包括手术切除、局部消融、经导管动脉化疗栓塞、系统化疗和分子靶向治疗[3]。由于肝癌的异质性和肿瘤微环境复杂,现有疗法的效果不佳,需要新治疗策略提高患者生存率和生活质量。

2024-12-01 接收
基金项目:安徽省学术和技术带头人及后备人选科研活动经费资助项目(编号:2022H291);安徽医科大学"抗炎免疫药物教育部重点实验室"开放课题资助项目(编号:KFJJ-2021-04);安徽医科大学横向课题经费资助项目(编号:2023009);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2023zhyx-C24)
作者简介:朱欣悦,女,硕士研究生;
李 涛,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:limedical1974@126.com

在此背景下,铁死亡作为一种新型细胞死亡机制,显示出广阔的应用前景。Dixon et al[4]提出了"铁死亡",不同于凋亡、坏死、自噬等,以铁依赖性和脂质过氧化、活性氧(reactive oxygen species,ROS)过量产生为特点。Erastin 和 RAS 选择性致死分子 3(RAS-selective lethal 3,RSL3)作为典型的铁死亡诱导剂,被广泛应用于研究中。它们通过不同的机制介导细胞发生铁死亡,在肝癌治疗中具有潜在的抗肿瘤作用[5-8]。然而,对于 Erastin 和 RSL3 在肝癌细胞中的作用机制及敏感性仍知之甚少。该研究使用肝癌细胞系作为研究对象,给予 Erastin 和 RSL3 治疗,观察细胞的生存率、形态学变化以及相关的分子和指标变化,构建肝癌铁死亡体外模型以及进一步确定模型的可靠性和稳定性,以期为开发针对肝癌的新型治疗策略提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人肝癌细胞系 HCCLM3、Huh7、

中国知网 https://www.cnki.net

HepG2、Hep3B 和 PLC/PRF/5 购自广州赛库生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 液体培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清(086-150)购自南京维森特生物技术公司；0.25%胰酶(C0201)、蛋白酶抑制剂(ST506)购自上海碧云天生物技术公司；PBS(BL302A)、青-链霉素双抗(100×)(BL505A)和 5× loading buffer(BL502B)购自合肥白鲨生物技术公司；无血清程序冻存液(C40100)和超敏 ECL 化学发光试剂盒(P10300)购自苏州新赛美生物技术公司；CCK-8 试剂(K1018)购自美国 APExBIO 公司；Erastin(S7242)和 RSL3(S8155)购自上海 Selleck 公司；二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO)(D8371)和脱脂奶粉(LP0033B)购自北京索莱宝科技公司；谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4，GPX4)(ab125066)购自英国 Abcam 公司；ACTB(#3700)购自美国 Cell Signaling Technology 公司；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(G+L)和山羊抗兔 IgG(G+L)购自武汉三鹰生物技术公司；脂质过氧化传感器 BODIPY 581/591 C11(D3861)和预染蛋白 marker(26616)购自美国 Thermo 公司；PVDF 膜(IPYH00010)购自美国 Millipore 公司；甘氨酸、十二烷基硫酸钠和吐温-20 购自上海生工生物工程公司。

1.1.3 主要仪器与设备 多功能酶标仪(型号：Multiskan SkyHigh)购自美国 Thermo 公司；低温高速离心机(型号：Centrifuge 5424)购自德国 Eppendorf 公司；蛋白电泳和转印系统(型号：VE-180B)、电泳仪电源(型号：EPS-300)和多功能成像仪(型号：Tanon 5200)购自上海天能生命科学有限公司；流式细胞仪(型号：DxFlex)购自上海贝克曼库尔特国际贸易有限公司；倒置显微镜(型号：IX73)购自日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肝癌细胞系 HCCLM3 和 Huh7 在培养过程中，采用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗的 DMEM 完全培养基。对于 HepG2、Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞系，则使用含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗的 MEM 完全培养基。传代操作在细胞密度超过 1×10^6 个/ml 时进行，每隔 2~3 d 进行 1 次传代，0.25% 胰酶消化，用 1 ml 新鲜培养基终止，制成单细胞悬液，保持细胞培养液中的细胞密度在 1×10^5~1×10^6 个/ml 范围内。

1.2.2 Erastin、RSL3 和 BODIPY 581/591 C11 储备液配制与保存 向 1 mg Erastin 中加入 182.8 μl DMSO，向 1 mg RSL3 中加入 226.8 μl DMSO，充分涡旋混匀，均配制成 10 mmol/L 的储备液；向 1 mg BODIPY 581/591 C11 加入 396.0 μl DMSO，充分溶解后混匀，配制成 5 mmol/L 的储备液。储备液均分装使用，于-80 ℃ 冰箱中保存。

1.2.3 CCK-8 法测定细胞活力 将生长状态良好、处于对数生长期的 HCCLM3、Huh7、HepG2、Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞分别接种于 96 孔板中，每孔接种 1×10^4 个细胞于 100 μl 完全培养基中，随后在 37 ℃，5% CO_2 的培养箱中培养 24 h，当细胞长至密度为 70% 左右时进行后续实验。然后将细胞按照实验设计分组，给予不同浓度的 Erastin 或 RSL3 孵育 24 h 后弃去培养基，向每孔添加含 10% CCK-8 试剂的 100 μl 无血清培养基，避光孵育 2 h 后使用多功能酶标仪检测在 450 nm 波长处的吸光度值。每种药物处理重复 3 次，完全培养基处理组作为阴性对照。使用 GraphPad Prism 8.0 分别计算不同肝癌细胞对 Erastin 和 RSL3 的 IC_{50}。

1.2.4 免疫印迹法检测 Erastin 和 RSL3 对肝癌细胞 GPX4 蛋白表达水平的影响 细胞经过不同的药物处理后弃去原培养基，使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行冰上裂解 30 min，离心获取总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度后热变性。将 30 μg 蛋白上样于 12.5% 的 SDS-PAGE，进行电泳，然后转移至 PVDF 膜上。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h，一抗(1∶1 000)4 ℃ 孵育过夜，TBST 清洗后，二抗(1∶10 000)室温孵育 2 h 后再次清洗。最后用增强化学发光底物检测免疫反应蛋白，并用 Tanon 成像系统显影，Image J 软件进行定量分析。

1.2.5 流式细胞术检测 Erastin 和 RSL3 对肝癌细胞脂质 ROS 的影响 将生长状态良好、处于对数生长期的 Huh7、HepG2 和 Hep3B 细胞分别接种于 6 孔板中，每孔接种 3×10^5 个细胞于 2 ml 完全培养基中，随后在 37 ℃，5% CO_2 的培养箱中培养，当细胞长至密度为 70% 左右时进行后续实验。然后将细胞按照实验设计分组，给予相应浓度的 Erastin 或 RSL3 作用 24 h 后弃去培养基，用胰酶收集细胞，离心获得细胞沉淀。将 BODIPY 581/591 C11 储存液按照 1∶1 000 比例稀释后，加入细胞沉淀中，置于 37 ℃ 孵箱，染色 30 min 后用 PBS 清洗 2 遍，PBS 重悬细胞后使用贝克曼流式分析仪和 Flowjo 软件对

中国知网 https://www.cnki.net

样本进行流式细胞术分析。

1.3 统计学处理 统计分析使用 GraphPad Prism 8.0 进行，所有数据均以均值±标准差表示。两组间比较采用 *t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 Erastin 对 5 种肝癌细胞增殖的影响及 IC_{50} CCK-8 结果显示，随着 Erastin 浓度上升，Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞存活率逐渐下降。提示这 3 种肝癌对 Erastin 的敏感性高，IC_{50} 均在 10 μmol/L 和 20 μmol/L 之间。见表 1。然而，随着 Erastin 浓度上升，HCCLM3 和 PLC/PRF/5 细胞存活率下降幅度小，当 Erastin 浓度达最大时，存活率仍有 65% 以上。见图 1。提示这两种肝癌细胞对 Erastin 不敏感。选择 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞用作后续 Erastin 诱导实验。

2.2 Erastin 作用后的肝癌细胞形态 光镜下结果显示：与 0 μmol/L 相比，处理组细胞部分出现皱缩、变圆、空泡化。见图 2。

2.3 不同浓度 RSL3 对 5 种肝癌细胞增殖的影响

表 1 Erastin 对不同肝癌细胞的 IC_{50}

Tab. 1 IC_{50} of Erastin in various HCC cells

HCC cell lines	IC_{50}(μmol/L)
Huh7	14.57
HCCLM3	>50.00
Hep3B	14.41
HepG2	15.19
PLC/PRF/5	>50.00

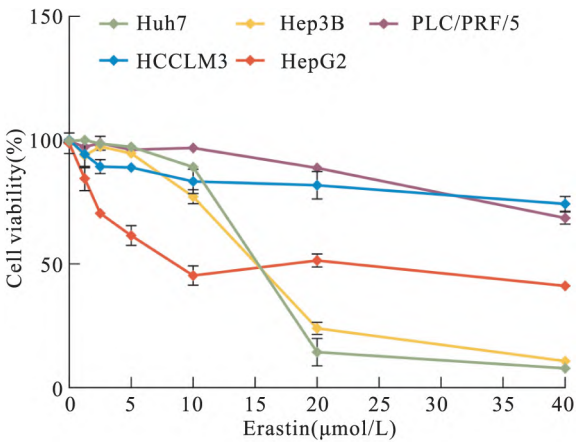

图 1 肝癌细胞对 Erastin 效果的影响

Fig. 1 Effect of Erastin on HCC cells

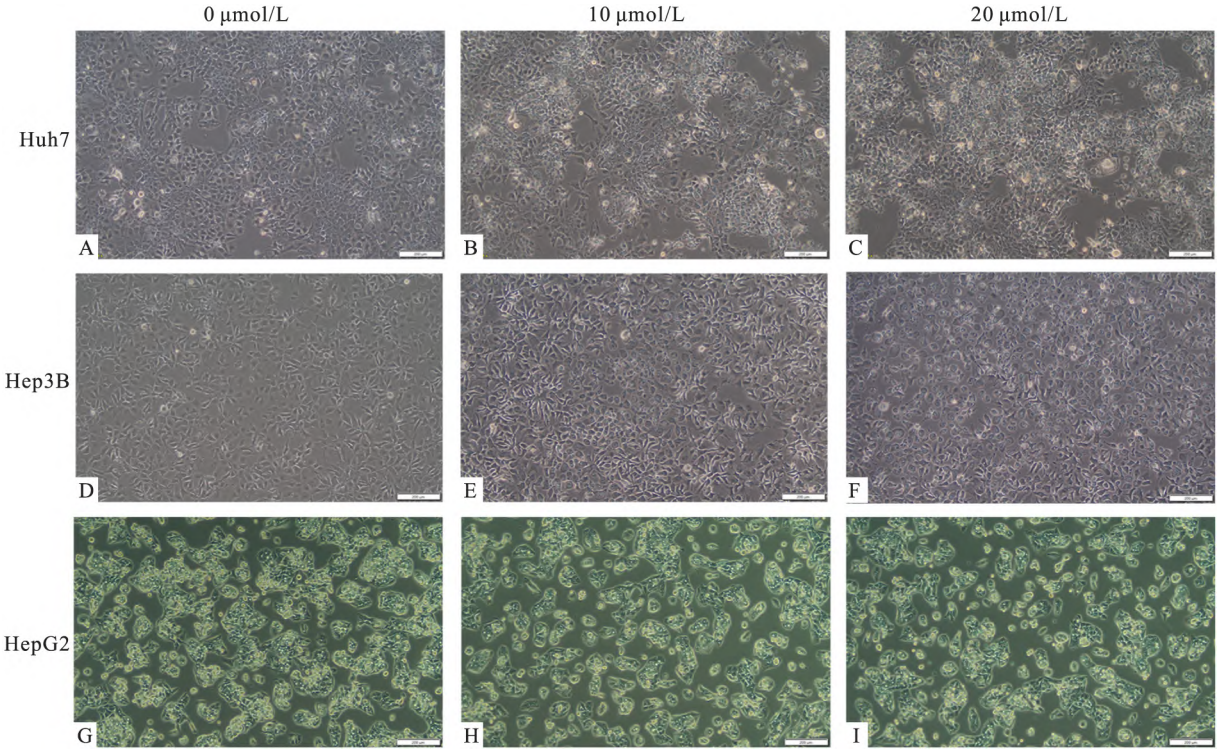

图 2 Erastin 作用后的肝癌细胞形态 ×100

Fig. 2 Morphology of HCC cells after treatment with Erastin ×100

A-C: Cell morphology of Huh7 cells after treatment with 0, 10, and 20 μmol/L Erastin; D-F: Cell morphology of Hep3B cells after treatment with 0, 10, and 20 μmol/L Erastin; G-I: Cell morphology of HepG2 cells after treatment with 0, 10, and 20 μmol/L Erastin.

中国知网 https://www.cnki.net

及 IC_{50} CCK-8 结果显示，随着 RSL3 浓度上升，Huh7 、Hep3B 和 HepG2 细胞存活率逐渐下降。提示这 3 种肝癌细胞对 RSL3 的敏感性高，Huh7 细胞的 IC_{50} 在 0.5 μmol/L 和 1 μmol/L 之间，Hep3B 和 HepG2 细胞的 IC_{50} 在 1 μmol/L 和 2 μmol/L 之间。见表 2。然而，随着 RSL3 浓度上升，HCCLM3 和 PLC/PRF/5 细胞存活率不再进一步降低，当 RSL3 浓度达最大时，存活率仍有 80% 以上。见图 3。提示这两种肝癌细胞对 RSL3 不敏感。选择 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞用作后续 RSL3 诱导实验。

表 2 RSL3 对不同肝癌细胞的 IC_{50}

Tab. 2 IC_{50} of RSL3 in various HCC cells

HCC cell lines	IC_{50}(μmol/L)
Huh7	0.70
HCCLM3	>50.00
Hep3B	1.97
HepG2	1.73
PLC/PRF/5	>50.00

2.4 RSL3 作用后的肝癌细胞形态 光镜下结果显示：与 0 μmol/L 相比，处理组细胞部分出现皱缩、变圆、空泡化。见图 4。

2.5 Erastin 诱导肝癌细胞 GPX4 的表达水平 免疫印迹结果显示，在 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞中，发现随着 Erastin 浓度的升高，GPX4 的蛋白表达水平逐渐下调($P<0.05$)。见图 5。

2.6 RSL3 诱导肝癌细胞 GPX4 的表达水平 免疫印迹结果显示，在 Huh7、Hep3B 和 HepG2 细胞

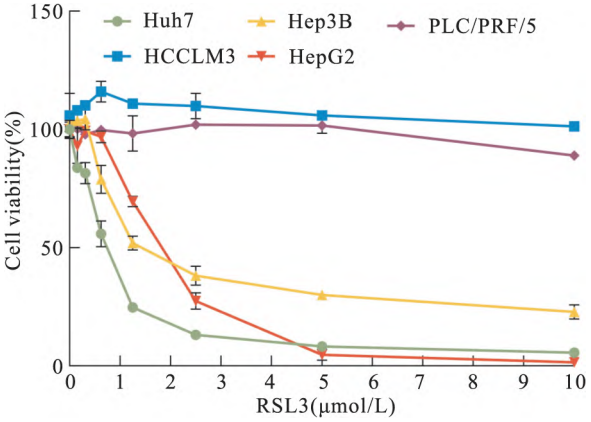

图 3 肝癌细胞对 RSL3 效果的影响

Fig. 3 Effect of RSL3 on HCC cells

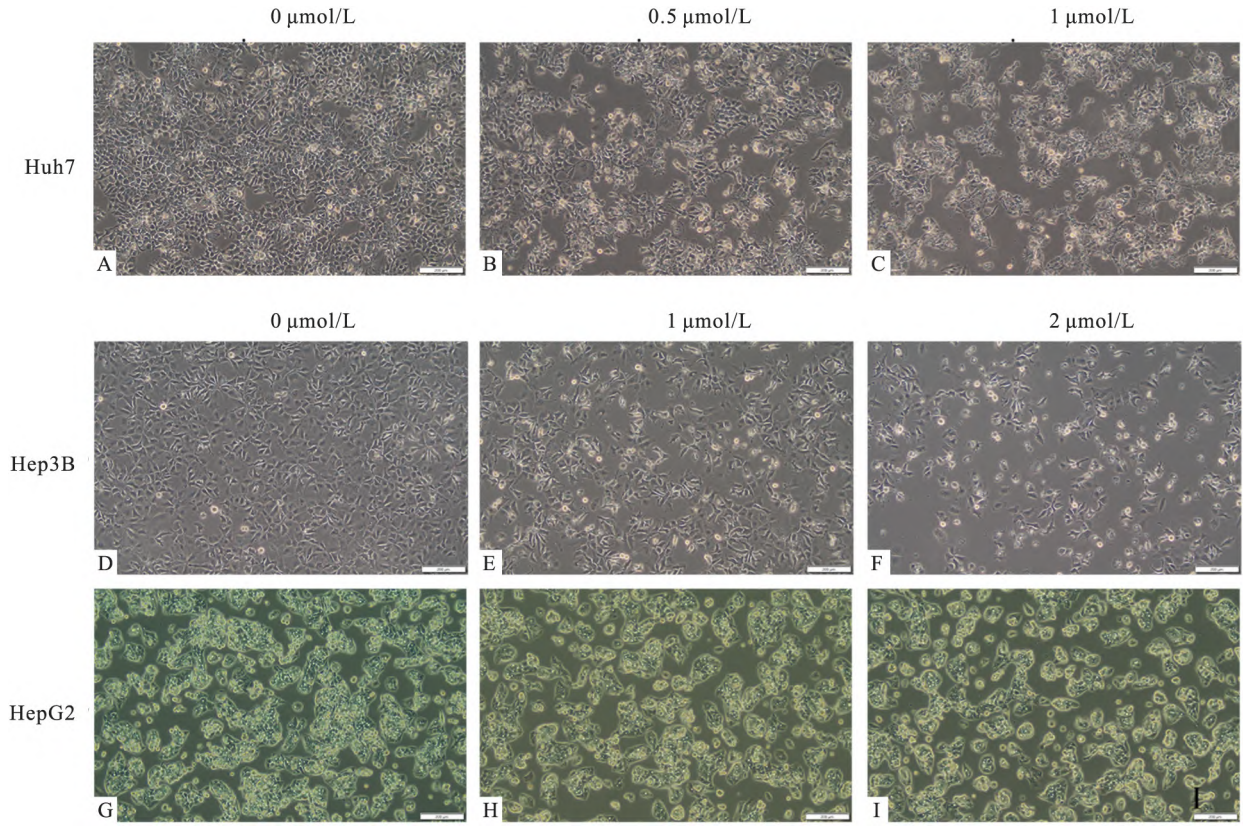

图 4 RSL3 作用后的肝癌细胞形态 ×100

Fig. 4 Morphology of HCC cells after treatment with RSL3 ×100

A-C: Cell morphology of Huh7 cells after treatment with 0, 0.5, and 1 μmol/L RSL3; D-F: Cell morphology of Hep3B cells after treatment with 0, 1, and 2 μmol/L RSL3; G-I: Cell morphology of HepG2 cells after treatment with 0, 1, and 2 μmol/L RSL3.

中国知网 https://www.cnki.net

中，随着 RSL3 浓度的升高，GPX4 的蛋白表达水平逐渐下调（$P<0.05$）。见图 6。

2.7 Erastin 诱导肝癌细胞脂质 ROS 水平 流式细胞术结果显示，与 0 μmol/L 组相较，10 μmol/L Erastin 处理 Huh7、Hep3B 和 HepG2 这 3 种肝癌细胞已经能够使细胞的脂质 ROS 水平增加（均 $P<0.01$），尽管 20 μmol/L Erastin 也能起到同样作用（均 $P<0.05$），但考虑到细胞毒性，因此，选择 10 μmol/L Erastin 作用 24 h 作为模拟肝癌铁死亡的良好模型。见图 7。

2.8 RSL3 诱导肝癌细胞脂质 ROS 水平 流式细胞术结果显示：在 Huh7 细胞中，与 0 μmol/L 组相较，0.5 μmol/L 和 1 μmol/L RSL3 处理后细胞的脂质 ROS 水平均增加（均 $P<0.001$）。在 Hep3B 和 HepG2 细胞中，与 0 μmol/L 组相较，1 μmol/L 和 2 μmol/L RSL3 处理后细胞的脂质 ROS 水平均增加（均 $P<0.01$）。考虑到细胞毒性的存在，选择 0.5 μmol/L RSL3 处理 Huh7 细胞、1 μmol/L RSL3 处理 Hep3B 和 HepG2 细胞用于体外模型的构建。见图 8。

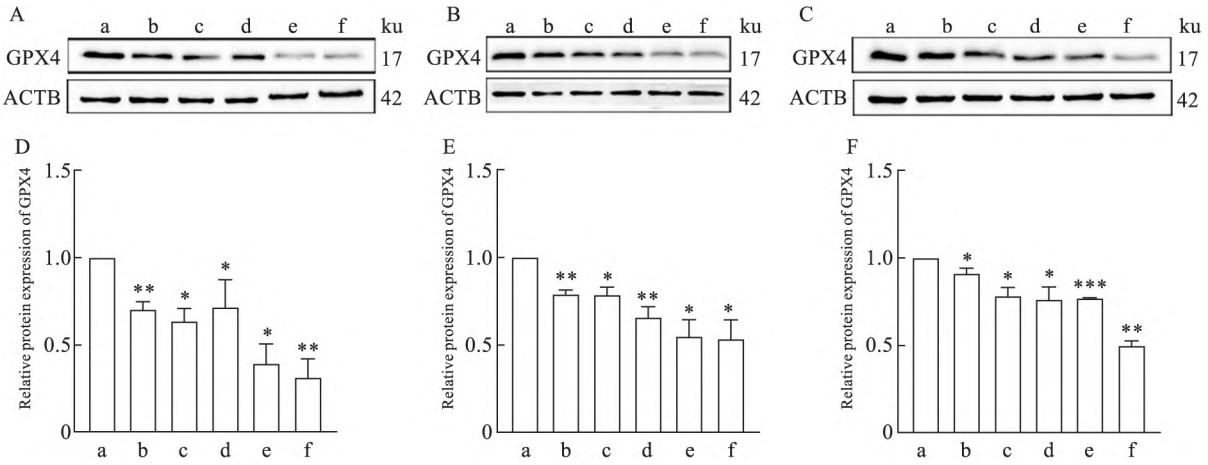

图 5 Erastin 对肝癌细胞 GPX4 表达水平的影响

Fig. 5 Effects of Erastin on the expression levels of GPX4 in HCC cells

A-C: Western blot results of GPX4 protein in Huh7, Hep3B, and HepG2 cells after Erastin treatment; D-F: Statistical analysis of Western blot results; a: 0 μmol/L group; b: 2.5 μmol/L group; c: 5 μmol/L group; d: 10 μmol/L group; e: 20 μmol/L group; f: 40 μmol/L group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ *vs* 0 μmol/L group.

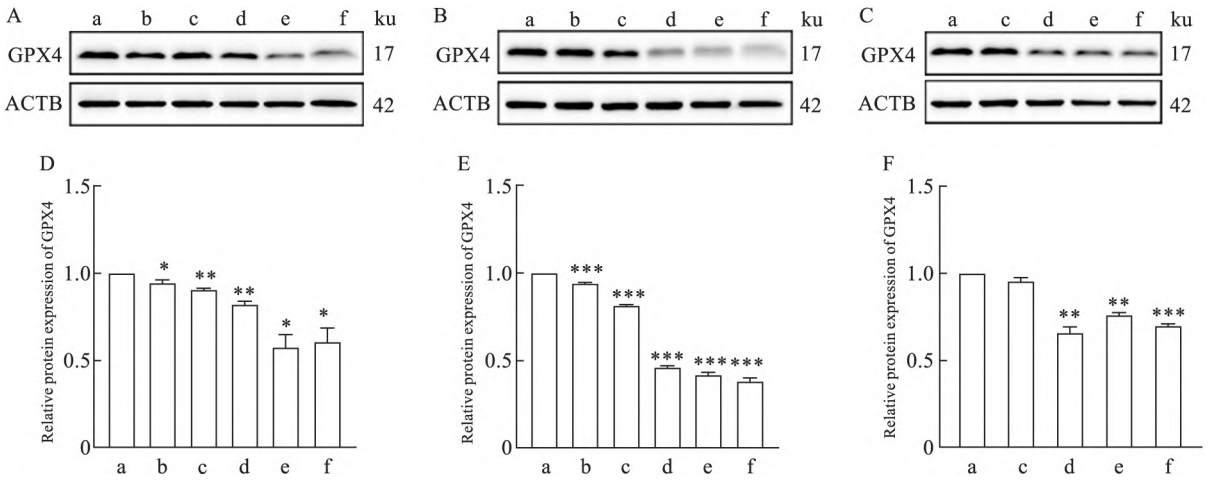

图 6 RSL3 对肝癌细胞 GPX4 表达水平的影响

Fig. 6 Effects of RSL3 on the expression levels of GPX4 in HCC cells

A-C: Western blot results of GPX4 protein in Huh7, Hep3B, and HepG2 cells after RSL3 treatment; D-F: Statistical analysis of Western blot results; a: 0 μmol/L group; b: 0.156 25 μmol/L group; c: 0.312 5 μmol/L group; d: 0.625 μmol/L group; e: 1.25 μmol/L group; f: 2.5 μmol/L group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ *vs* 0 μmol/L group.

中国知网 https://www.cnki.net

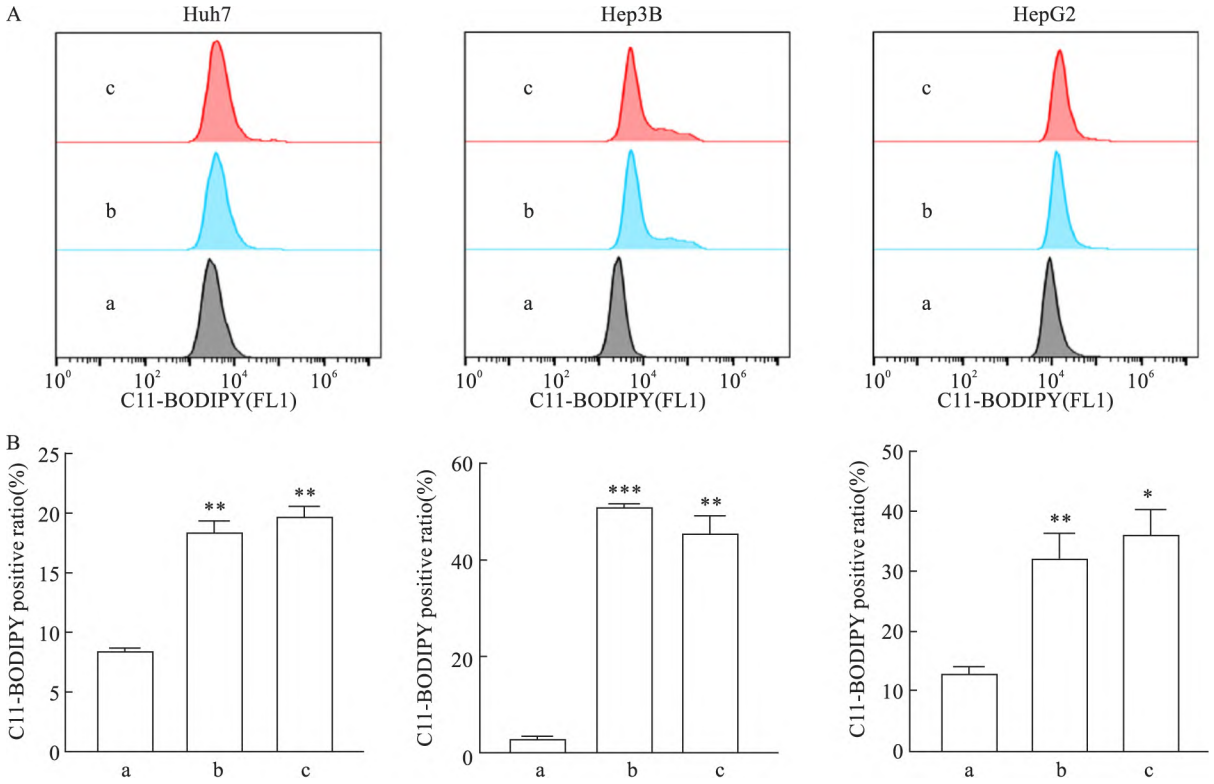

图 7 Erastin 对肝癌细胞脂质 ROS 的影响

Fig. 7 Effects of Erastin on lipid ROS in HCC cells

A: Histogram results of lipid ROS detected by flow cytometry in Huh7, Hep3B, and HepG2 cells after Erastin treatment; B: Statistical analysis of flow cytometry results; a: 0 μmol/L group; b: 10 μmol/L group; c: 20 μmol/L group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ *vs* 0 μmol/L group.

3 讨论

HCC 是全球最常见的恶性肿瘤之一，起病隐匿、进展迅速，早期诊断率低，且易发生转移和耐药。尽管靶向治疗和免疫治疗是治疗中晚期 HCC 的优选方案，但是 HCC 患者的总体生存仍然是一个挑战，因此，迫切需要探索新的治疗靶点和策略为患者的个体化精准诊疗提供帮助。

铁死亡是铁离子依赖的脂质过氧化物和活性氧不断累积而最终导致细胞程序性死亡的方式[4]，而且相较于普通细胞，癌细胞具有更为显著的铁依赖性[9-10]，在癌症的治疗中具有巨大潜力。研究[11-13]表明，铁死亡与 HCC 的发生、发展密切相关，诱导 HCC 发生铁死亡能够抑制 HCC 进展，并且能够逆转 HCC 耐药，为 HCC 的治疗提供了新的方向。

Erastin 和 RSL3 是两种被广泛研究的铁死亡诱导剂，它们通过不同的机制诱导细胞死亡，其中 Erastin 针对系统 Xc-间接抑制 GPX4 引发铁依赖性的氧化应激，而 RSL3 则通过直接抑制 GPX4 来诱导细胞死亡。近来有学者将铁死亡诱导剂与放疗、化疗和免疫治疗相结合，不仅能够诱导癌细胞的铁死亡机制发挥直接抗癌作用，而且能够增强肿瘤对于放疗、化疗和免疫治疗的敏感性。以往的研究[14-16]报道经典的铁死亡诱导剂 Erastin 和 RSL3 能够诱导肝癌细胞发生铁死亡，但是不同肝癌细胞对其的反应性和适应性尚不清楚。该研究通过对多种肝癌细胞应用铁死亡诱导剂 Erastin 和 RSL3 进行敏感性测试，发现不同肝癌细胞株对这两种化合物的反应存在明显差异。该研究中观察到 Huh7、Hep3B 和 HepG2 这 3 种肝癌细胞对 Erastin 和 RSL3 的敏感性较高，当诱导剂达到一定浓度时，与对照组相比，细胞发生明显的形态变化，包括细胞皱缩、变圆、空泡化等，而且 Erastin 和 RSL3 对铁死亡标志物 GPX4 的表达量具有浓度依赖性的调节作用，这进一步支持了这两种化合物对细胞铁代谢和氧化应激反应的影响。脂质过氧化是铁死亡的标志性特征之一[17]，与对照组相比，在使用 10 μmol/L Erastin 处理 3 种肝癌细胞、0.5 μmol/L RSL3 处理 Huh7 细胞、1 μmol/L RSL3 处理 Hep3B 和 HepG2 细胞时细胞脂质 ROS 明显增加，直接反映了细胞发生了铁死亡，可以用于构建体外诱导铁死亡的肝癌模型；尽管

中国知网 https://www.cnki.net

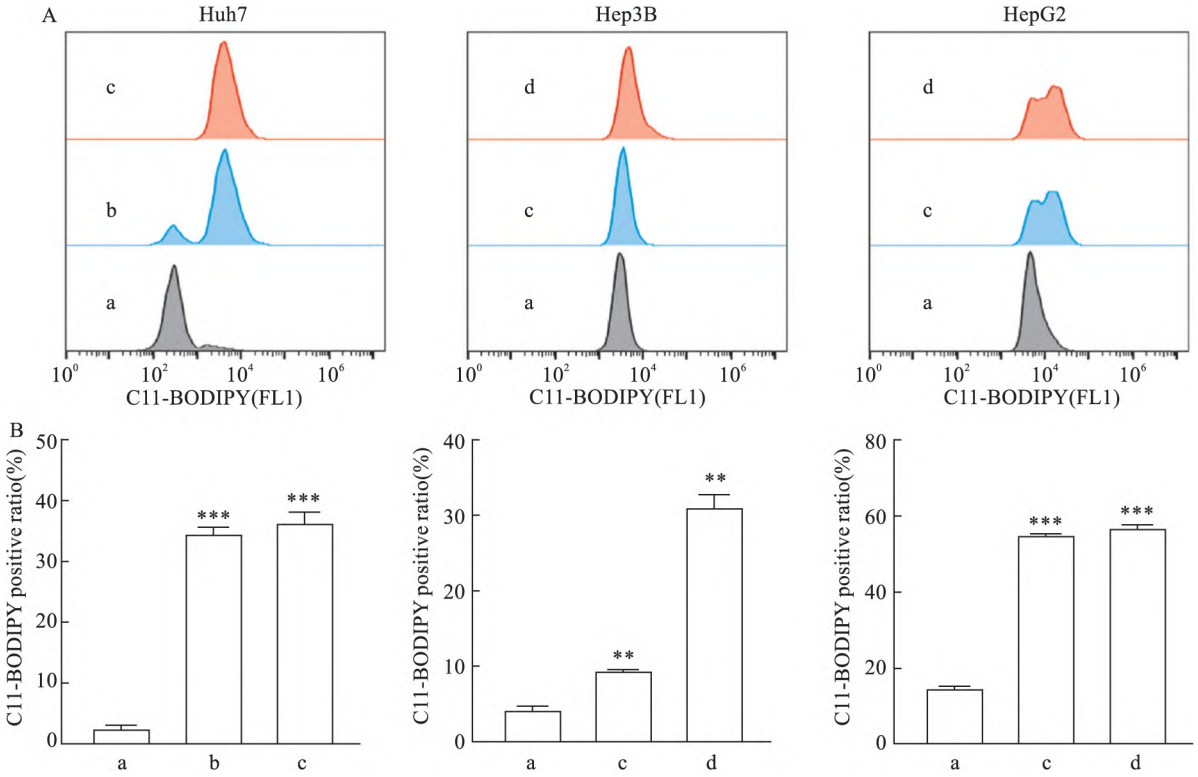

图 8 RSL3 对肝癌细胞脂质 ROS 的影响

Fig. 8 Effects of RSL3 on lipid ROS in HCC cells

A: Histogram results of lipid ROS detected by flow cytometry in Huh7, Hep3B, and HepG2 cells after RSL3 treatment; B: Statistical analysis of flow cytometry results; a: 0 μmol/L group; b: 0.5 μmol/L group; c: 1 μmol/L group; d: 2 μmol/L group; $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ *vs* 0 μmol/L group.

HCCLM3 和 PLC/PRF/5 对 Erastin 和 RSL3 的敏感性较低，但这也提醒今后在使用这些化合物时应考虑到不同肝癌细胞株的差异性反应。

综上所述，该研究揭示了不同肝癌细胞对铁死亡诱导剂 Erastin 和 RSL3 的敏感性差异，深入了解肝癌细胞对 Erastin 和 RSL3 的反应特点，为进一步探索这些化合物在肝癌治疗中的应用提供了重要参考。这些结果为个体化治疗和开发新的治疗策略提供了有益的信息，对提高肝癌患者的治疗效果具有重要意义，也为铁死亡诱导剂在肝癌治疗中的应用提供了新的思路和可能性。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49. doi: 10.3322/caac.21660.

[2] Vogel A, Meyer T, Sapisochin G, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-62. doi: 10.1016/s0140-6736(22)01200-4.

[3] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [J]. N Engl J Med, 2019, 380(15): 1450-62. doi: 10.1056/nejmra1713263.

[4] 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): 1060-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

[5] Mo Y, Zou Z, Chen E. Targeting ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Int, 2024, 18(1): 32-49. doi: 10.1007/s12072-023-10593-y.

[6] Ajoolabady A, Tang D, Kroemer G, et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and targeted therapy [J]. Br J Cancer, 2023, 128(2): 190-205. doi: 10.1038/s41416-022-01998-x.

[7] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-79. doi: 10.1038/cdd.2015.158.

[8] Yang W S, Stockwell B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells [J]. Chem Biol, 2008, 15(3): 234-45. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.02.010.

[9] Hassannia B, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Targeting ferroptosis to iron out cancer [J]. Cancer Cell, 2019, 35(6): 830-49. doi: 10.1016/j.ccell.2019.04.002.

[10] Lei G, Zhuang L, Gan B. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(7): 381-96. doi: 10.1038/s41568-022-00459-0.

[11] Gao R, Kalathur R K R, Coto-Llerena M, et al. YAP/TAZ and ATF4 drive resistance to Sorafenib in hepatocellular carcinoma by preventing ferroptosis [J]. EMBO Mol Med, 2021, 13(12):

中国知网 https://www.cnki.net

e14351. doi: 10.15252/emmm.202114351.
[12] Sun J, Zhou C, Zhao Y, et al. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by driving EGFR endosomal trafficking and inhibiting NRF2 activation [J]. Redox Biol, 2021, 41: 101942. doi: 10.1016/j.redox.2021.101942.
[13] Bai T, Lei P, Zhou H, et al. Sigma-1 receptor protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(11): 7349-59. doi: 10.1111/jcmm.14594.
[14] Li L, Xing T, Chen Y, et al. *In vitro* CRISPR screening uncovers CRTC3 as a regulator of IFN-γ-induced ferroptosis of hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 331. doi: 10.1038/s41420-023-01630-8.
[15] Du Y, Zhou Y, Yan X, et al. APE1 inhibition enhances ferroptotic cell death and contributes to hepatocellular carcinoma therapy [J]. Cell Death Differ, 2024, 31(4): 431-46. doi: 10.1038/s41418-024-01270-0.
[16] Yao F, Deng Y, Zhao Y, et al. A targetable LIFR-NF-κB-LCN2 axis controls liver tumorigenesis and vulnerability to ferroptosis [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 7333. doi: 10.1038/s41467-021-27452-9.
[17] Pope L E, Dixon S J. Regulation of ferroptosis by lipid metabolism [J]. Trends Cell Biol, 2023, 33(12): 1077-87. doi: 10.1016/j.tcb.2023.05.003.

Establishment of an *in vitro* model for Erastin and RSL3-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma

Zhu Xinyue[1], Ren Qiaohui[1], Zang Yan[1], Zhou Xinyi[1], Yao Junxiao[1], Wang Lianzi[1], Sha Xudong[2], Li Tao[1]
([1]*Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022; [2]*Dept of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai* 200025)

Abstract ***Objective*** To establish an *in vitro* model of ferroptosis induced by Erastin and RAS-selective lethal 3 (RSL3) in hepatoma cells, and to provide theoretical basis for the development of novel therapeutic strategies for HCC. ***Methods*** Hepatoma cells (HCCLM3, HepG2, Hep3B, Huh7 and PLC/PRF/5) in logarithmic growth phase were treated with Erastin (0-40 μmol/L) and RSL3 (0-10 μmol/L) at double concentrations respectively. After 24 h, CCK-8 method was used to detect cell viability, draw growth curve, calculate IC_{50}, and HCC cells sensitive to inducers were selected for follow-up experiments. The effect of inducer on the state of hepatoma cells was observed under light microscope, and immunoblotting and flow cytometry were used to verify whether the ferroptotic model *in vitro* was successfully constructed. ***Results*** Huh7, Hep3B and HepG2 cells were sensitive to Erastin and RSL3, but HCCLM3 and PLC/PRF/5 were insensitive to Erastin and RSL3. When the concentration of Erastin and RSL3 reached the maximum, the survival rate was still above 65%. Huh7, Hep3B and HepG2 cells were selected for subsequent experiments. Compared with the control group, the expression of Glutathione peroxidase 4 (GPX4), a ferroptotic marker, was down-regulated in a concentration-dependent manner. In Huh7, Hep3B and HepG2 cells, lipid reactive oxygen species (ROS) levels significantly increased after 24 h treatment with 10 μmol/L and 20 μmol/L Erastin, respectively; in Huh7 cells, lipid ROS levels significantly increased after 24 h treatment with 0.5 μmol/L and 1 μmol/L RSL3, respectively; in Hep3B and HepG2 cells, lipid ROS levels significantly increased after 24 h treatment with 1 μmol/L and 2 μmol/L RSL3, respectively, compared with control group. ***Conclusion*** Huh7, Hep3B and HepG2 cells are highly sensitive to Erastin and RSL3. Huh7, Hep3B and HepG2 cells treated with 10 μmol/L Erastin for 24 h are good models for simulating ferroptosis induced by Erastin *in vitro*, Huh7 cells treated with 0.5 μmol/L RSL3 for 24 h and Hep3B and HepG2 cells treated with 1 μmol/L RSL3 for 24 h are good models for simulating ferroptosis induced by RSL3 *in vitro*.

Key words hepatocellular carcinoma; Erastin; RSL3; ferroptosis; *in vitro* model
Fund programs Anhui Provincial Academic and Technical Leaders and Reserve Candidates Project (No. 2022H291); Open Project of Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, at Anhui Medical University (No. KFJJ-2021-04); Commercial Research Funds of Anhui Medical University (No. 2023009); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2023zhyx-C24)
Corresponding author Li Tao, E-mail: limedical1974@126.com

中国知网 https://www.cnki.net