

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-03-001

· 专家论坛 ·

· EXPERT FORUM ·

## 基于 RNA-seq 技术探索铁死亡在肝癌细胞对仑伐替尼耐药中的作用

廖思聪<sup>abc</sup>, 朱彩玉<sup>abc</sup>, 邬慧贤<sup>abc</sup>, 金俊飞<sup>abc</sup>

(桂林医学院附属医院 a.广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, b.广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室, c.中美健康与疾病脂质研究中心, 桂林 541001)

**专家简介** 金俊飞, 二级研究员, 东南大学遗传学博士, 留美博士后, 博士生导师。现任桂林医学院学术委员会副主任、桂林医学院附属医院副院长、广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室主任, 入选“国家百千万人才工程”, 被授予“国家有突出贡献中青年专家”称号, 享受国务院政府特殊津贴。曾任美国南卡罗莱纳医科大学 Assistant Professor (Visiting, Faculty), 是桂林市第二批/第三批漓江学者, 桂林市 2019 年度第二类高层次人才, 广西医学高层次骨干人才培养“139”计划培养人选, 广西高校高水平创新团队及卓越学者, 广西高校引进海外高层次人才“百人计划”学者, 广西优秀专家, 广西特聘专家。获广西科学技术奖自然科学类一等奖(排名第一)、首届广西创新争先个人奖, 并获“桂林市最美科技工作者”称号; 是教育部“长江学者奖励计划”通信评审专家, 中国细胞生物学学会第十三届理事会理事, 中国生物物理学会代谢生物学会理事, 《中国动脉硬化杂志》编辑委员会常务委员。主持国家自然科学基金 4 项, 主持中央引导地方科技发展专项资金项目 1 项, 主持广西自然科学基金重大项目 1 项、重点项目 1 项。主要研究鞘脂代谢通路与细胞行为及肝脏疾病, 发表高水平论文 41 篇, 其中 Top 期刊论文 12 篇, 多篇发表在 *Hepatology*、*J Exp Med.*、*Cell Death & Disease* 等国际知名杂志。



**摘要** **目的** 探究铁死亡在肝癌细胞对仑伐替尼(Lenva)耐药中的作用, 为预防或逆转 Lenva 耐药提供新思路。**方法** 体外培养人肝癌细胞系 PLC/PRF/5, 即亲本细胞(PC)采用梯度浓度诱导法构建 Lenva 耐药细胞(LRC); 利用 RNA-seq 技术对 LRC 和 PC 两种细胞进行转录组测序, 测序结果进行差异表达基因分析及 KEGG 富集分析; 采用 CCK-8 法测定细胞活力, 采用免疫印迹检测铁死亡相关蛋白, 利用 DHE 探针检测细胞活性氧(ROS), 应用透射电镜观察细胞线粒体形态。**结果** Lenva 处理 PC 和 LRC 24 h, 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为 24.88 μmol/L 和 89.34 μmol/L, 提示 Lenva 耐药人肝癌细胞体外诱导成功。RNA-seq 测序检测到 12 106 个基因, 与 PC 比较, LRC 88 个基因上调, 197 个基因表达下调。差异基因的 KEGG 通路富集分析结果显示, 铁死亡信号通路位列其中。利用

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81960520); 广西科技厅中央引导地方科技发展资金项目(桂科 ZY21195024); 广西自然科学基金重点项目(2020GXNSFDA238006); 桂林市第三批漓江学者支持计划(2022-5-07)。

**第一作者:** 廖思聪, 硕士, 助理研究员, 研究方向为神经鞘脂代谢及肝脏相关疾病。

**通信作者:** 金俊飞, junfeijin@glmc.edu.cn。

10  $\mu\text{mol/L}$  Lenva 处理细胞 48 h, 与 PC 相比, LRC 铁死亡相关蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达增加, ROS 含量降低。电镜结果显示, 与 PC 相比, 特征性铁死亡线粒体形态改变的 LRC 明显减少。结论 肝癌细胞对 Lenva 耐药可能涉及多种基因和信号途径, 其中铁死亡抵抗机制可能是引起肝癌细胞耐 Lenva 的关键。

**关键词:** 仑伐替尼; 肝癌; 耐药; 铁死亡

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)03-0001-09

## Exploring the role of ferroptosis in the resistance of liver cancer cells to lenvatinib based on RNA-seq technology

LIAO Sicong<sup>abc</sup>, ZHU Caiyu<sup>abc</sup>, WU Huixian<sup>abc</sup>, JIN Junfei<sup>abc</sup>

(a. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in Liver Injury and Repair, b. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Basic Research in Sphingolipid Metabolism Related Diseases, c. China-USA Lipids in Health and Disease Research Center, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

**Abstract Objective** To explore the role of ferroptosis in the resistance of liver cancer cells to lenvatinib (Lenva), and provide new ideas for preventing or reversing Lenva resistance. **Methods** Human liver cancer cell line PLC/PRF/5 cells also known as parental cells (PC) were cultured in vitro, and Lenva resistant cells (LRG) were constructed using gradient concentration induction method. RNA-seq technology was used for transcriptome sequencing of LRC and PC. Differential expression gene analysis and KEGG enrichment analysis were completed. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Expressions of ferroptosis related proteins were detected by Western blot. The reactive oxygen species (ROS) was detected using DHE probes, and changes in mitochondrial morphology were observed by transmission electron microscopy (TEM). **Results** The half inhibitory concentration  $IC_{50}$  of Lenva in PC group and LRC group was 24.88  $\mu\text{mol/L}$  and 89.34  $\mu\text{mol/L}$ , respectively, indicating the successful induction of Lenva resistant human liver cancer cells in vitro. A total of 12 106 genes were detected by RNA-seq, among which 88 genes were upregulated and 197 genes were downregulated in the LRC group compared to the PC group. The KEGG pathway enrichment analysis of differential expression genes showed that ferroptosis signaling pathway was enriched within it. Under the exposure of Lenva (10  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h), the expression of ferroptosis related proteins SLC7A11 and GPX4 were increased in the LRC group compared to the PC group, while the content of ROS was decreased. TEM results showed that compared to the PC group, the characteristic mitochondrial morphological changes related to ferroptosis in the LRC group were significantly reduced. **Conclusion** Lenva resistance in liver cancer cells may involve multiple genes and signaling pathways, among which ferroptosis resistance may be a key role in causing Lenva resistance.

**Keywords:** lenvatinib; liver cancer; drug resistance; ferroptosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌最常见的类型,也是全球癌症相关死亡的主要原因之一。HCC 具有发病隐匿、恶性程度高、易转移复发等特点,缺少特异性早期诊断标志物。因此,大多数 HCC 患者确诊时处于中晚期,失去了手术切除的最佳机会,分子靶向药物常用于治疗不能手术的 HCC 患者<sup>[1-2]</sup>。仑伐替尼 (Lenvatinib, Lenva) 是一种新型口服酪氨酸激酶小分子抑制剂,2018 年被 FDA 批准成为治疗晚期 HCC 的一线靶向药物。临床试验结果显示,服用 Lenva 的 HCC 患者,他们的中位生存时间长于服用索拉菲尼的 HCC 患者<sup>[3]</sup>。然而,分子靶向药物的应用不可避免会出现耐药,目前, Lenva 耐药机制及其防治策略方面的研究相对缺乏。

铁死亡 (ferroptosis) 是近年来发现的一种铁依赖的脂质过氧化物积累所引起的程序性死亡方式,已被证实在神经退行性疾病、心血管疾病、肿瘤等多种疾病中发挥重要作用<sup>[4-7]</sup>。越来越多的研究<sup>[8-9]</sup> 结果表明,铁死亡失调可能参与多种药物的耐药过程,靶向铁死亡干预可能是预防和逆转肿瘤耐药的策略之一。本研究通过构建 Lenva 耐药的肝癌细胞系,基于 RNA-seq 分析,探讨铁死亡在肝癌细胞对 Lenva 耐药中的作用,为预防或逆转 Lenva 耐药提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞 PLC/PRF/5 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所; Lenva、CCK-8 试剂盒购自 MCE 公司; Trizol 总 RNA 抽提试剂盒和 DMEM 培养基购自 Thermo Fisher 公司; GPX4 抗体、SLC7A11 抗体购自 Abcam 公司; ABCC1 抗体和  $\beta$ -actin 抗体购自 Proteintech 公司; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购自北京普利莱基公司。

### 1.2 细胞培养及耐药株的构建

人肝癌细胞 PLC/PRF/5 即亲本细胞 (PC), 使用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基培

养,将细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,待细胞融合达 80% 时,采用胰酶消化传代细胞。采用梯度浓度诱导法 (最大药物浓度为 100  $\mu$ mol/L) 构建 Lenva 耐药的人肝癌细胞 PLC/PRF/5, 即 Lenva 耐药细胞 (lenvatinib resistance, LRC), 经过 7 个多月的诱导成功构建,以 Lenva 浓度 10  $\mu$ mol/L 作为耐药株的维持药物浓度。

### 1.3 转录组测序

使用 Trizol 试剂提取 LRC 和 PC 的总 RNA, 通过基因文库试剂盒 (VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina ©, Vazyme 公司) 构建转录组文库, 将构建好的文库使用基因测序仪 (Illumina NovaSeq 6000) 测序。对测序序列原始数据进行过滤, 将过滤得到的 Clean Reads 比对到参考序列, 使用 String Tie 软件进行基因表达定量分析。测序数据的质量控制分析显示, 测序碱基识别精度大于 99.9% 的碱基百分比均在 96.05% 以上, 碱基含量分布稳定, 无 AT 或 GC 碱基分离现象。本次测序数据质量良好, 满足后续分析要求。根据基因的表达量, 通过 DESeq2 (1.26.0 版) 软件进行不同组间基因的差异表达分析, 将差异倍数  $\geq 2$  且  $P < 0.05$  作为差异表达基因筛选标准, 并对差异基因进行 KEGG 数据库通路富集分析。

### 1.4 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期细胞消化、离心, 按  $5 \times 10^3$  个/孔细胞接种至 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h, 向培养板中加入含设定药物浓度的完全培养基。待细胞培养到设定的时间点后, 弃去培养板中的培养基, 加入配好的 CCK-8 工作溶液 100  $\mu$ L/孔, 将培养板置于培养箱内孵育 1~2 h, 用酶标仪测定吸光度, 检测波长为 450 nm, 计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验孔吸光度 - 空白孔吸光度) / (对照孔吸光度 - 空白孔吸光度)  $\times 100\%$ , 其中空白孔为试剂对照, 没有加细胞和药物。

## 1.5 免疫印迹

取各组细胞消化、离心后,细胞加入事先配制的含蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液,于冰上裂解 15 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定蛋白浓度。上清液蛋白样品加入 5×蛋白上样缓冲液,置于 100℃金属浴中,加热 5 min,使蛋白样品充分变性。蛋白样品经 SDS-PAGE 胶电泳分离,电转印蛋白至 PVDF 膜上,用 5%脱脂牛奶于室温封闭 1 h 后,加入相应的一抗,4℃孵育过夜。TBST 洗膜后加入二抗,室温孵育 1 h,洗膜后,加入 ECL 化学发光液,于 BLT GelView 6000M 化学发光成像仪中曝光蛋白条带。以  $\beta$ -actin 作为内参蛋白,评估各目的蛋白的相对表达量。

## 1.6 细胞 ROS 检测

取 LRC 和对应 PC,按  $5 \times 10^3$  个/孔细胞接种于 96 孔细胞培养板中,培养 24 h,经 Lenva 处理 48 h 后,去除细胞培养基,加入 10  $\mu$ mol/L 无血清的 DHE 探针工作液,细胞经 37℃孵育 1 h 后,弃去含 DHE 探针的培养液,再用 PBS 洗涤 3 次,最后采用 SpectraMax M 多功能微孔板读板机进行荧光检测。

## 1.7 透射电镜观察细胞线粒体形态

去除细胞培养基,经 PBS 清洗后,加入 2.5%戊二醛于 4℃固定过夜,随后加入 1%锇酸固定 2.5 h,乙醇梯度脱水后,采用环氧树脂包埋样品。包埋剂完全聚合凝固后,采用 Leica EM UC7 超薄切片机对样品进行 70 nm 厚度的超薄切片,随后经醋酸铀、柠檬酸铅染液依次染色 15 min,最后采用 HT-7700 透射电子显微镜分析,拍摄图像。

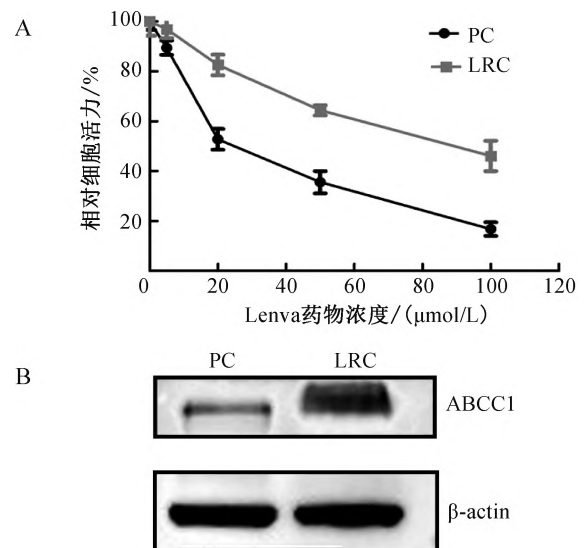
## 1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Lenva 耐药肝癌细胞

采用梯度浓度诱导法构建 LRC,与 PC 比较,随着 Lenva 浓度的增加,LRC 和 PC 活力均逐渐下降,结果如图 1A 所示。Lenva 干预 24 h 后,PC 和 LRC 的半数抑制浓度(half inhibition concentration,  $IC_{50}$ )分别为 24.88  $\mu$ mol/L 和 89.34  $\mu$ mol/L。与 PC 相比,耐药相关蛋白 ABCC1(ATP-binding cassette subfamily C member 1)在 LRC 中的表达明显增加,结果如图 1B 所示。这说明体外 Lenva 耐药人肝癌细胞构建成功。

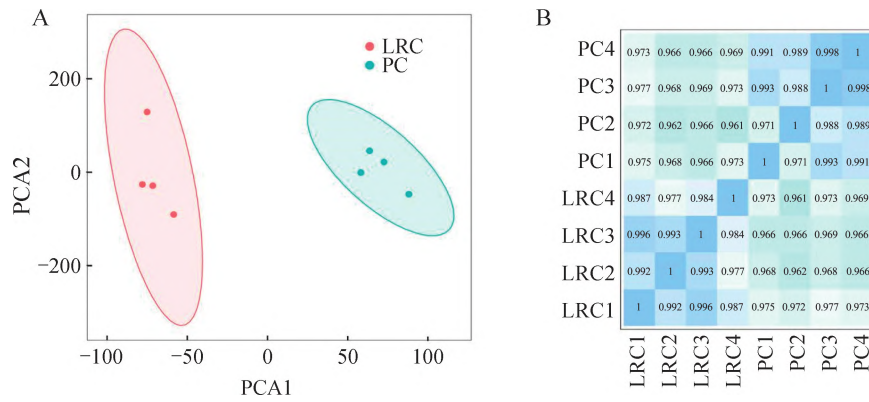


注:A.细胞活力分析;B.免疫印迹(Western blot)检测耐药相关蛋白 ABCC1 的表达。

图1 耐 Lenva 的肝癌细胞鉴定

### 2.2 基因表达

RNA-seq 测序结果经主成分分析(principal component analysis, PCA)显示,PC 和 LRC 两组间的基因表达存在差异,组内样本一致性较好,基因表达结果如图 2A 所示。以皮尔逊相关系数  $r$  (Pearson's correlation coefficient) 的平方( $r^2$ )作为生物学重复相关性的关键评价指标,基因表达量的  $r^2$  均大于 0.960,结果如图 2B 所示,提示组内样本具有较好的重复性。



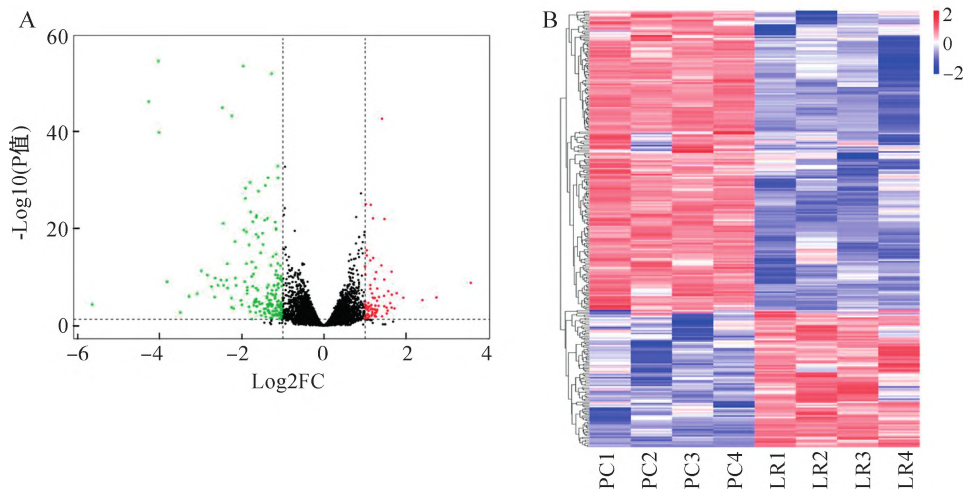
注:A.LRC 和对应的 PC RNA-seq 主成分分析;B.LRC 组和 PC 组组间基因表达量相关性分析。

图 2 RNA-seq 分析基因表达

### 2.3 差异表达基因

RNA-seq 测序共检测到 12 106 个基因,基因表达火山图如图 3A 所示。差异表达基因聚类分析结

果如图 3B 所示。与 PC 组比较,LRC 组有 88 个基因上调,197 个基因表达下调,且差异表达基因的聚类效果较好。



注:A.LRC 和 PC 差异表达基因的火山图;B.LRC 和 PC 差异表达基因的聚类分析热图。

图 3 差异基因表达分析

### 2.4 差异基因的 KEGG 通路富集

差异基因的 KEGG 通路富集结果如图 4 所示。Q 值最小的前 18 个通路包括化学致癌、药物代谢和铁死亡等,KEGG 通路富集分析结果如表 1 所示。

富集到铁死亡通路中的差异基因有 3 个,包括溶质载体家族 3 的成员 2 (solute carrier family 3 member 2, SLC3A2)、血红素加氧酶 1 (hemeoxygenase 1, HMOX1)和铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, CP)。

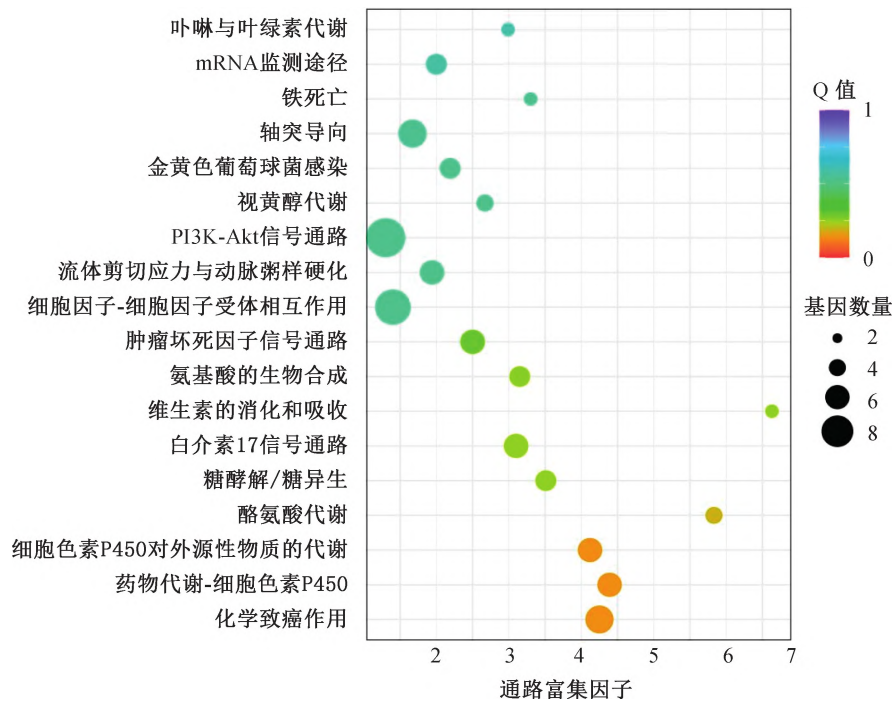


图 4 差异基因的 KEGG 通路富集图

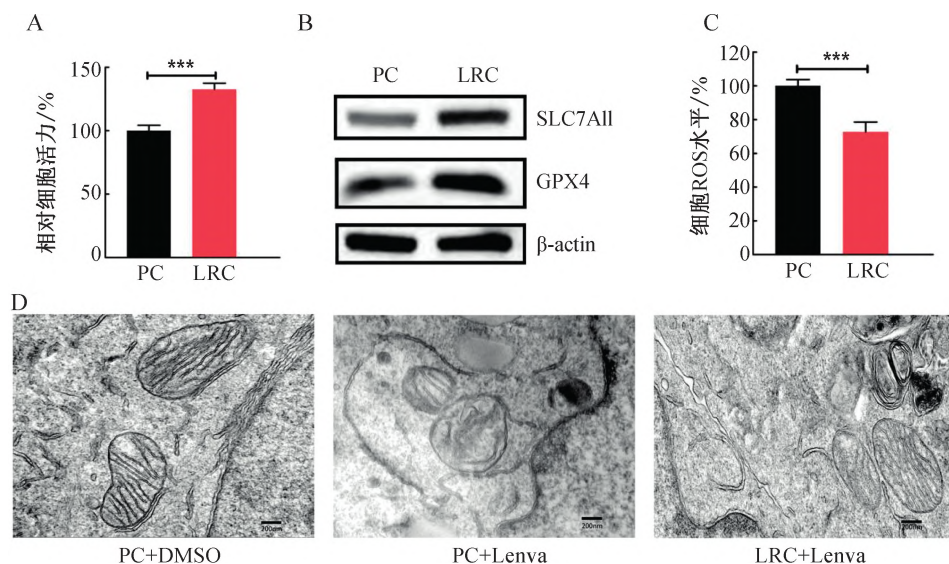
表 1 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析

信号通路	富集因子	Q 值	差异表达基因
化学致癌作用	4.75	0.135	ADH1C;ADH4;ALDH3A1;GSTA2;GSTA3;PTGS2;UGT1A6
药物代谢-细胞色素 P450	4.89	0.135	ADH1C;ADH4;ALDH3A1;GSTA2;GSTA3;UGT1A6
细胞色素 P450 对外源性物质的代谢	4.62	0.135	ADH1C;ADH4;ALDH3A1;GSTA2;GSTA3;UGT1A6
酪氨酸代谢	6.33	0.191	ADH1C;ADH4;ALDH3A1;LRTOMT
白介素 17 信号通路	3.60	0.251	CCL20;CXCL8;JUN;MAPK4;PTGS2;S100A9
糖酵解/糖新生	4.01	0.251	ADH1C;ADH4;ALDH3A1;ENO3;G6PC1
维生素的消化和吸收	7.13	0.251	APOA1;APOA4;SLC52A3
氨基酸的生物合成	3.65	0.260	ABHD14A-ACY1;ARG1;ENO3;PHGDH;PSAT1
肿瘤坏死因子信号通路	3.00	0.299	CCL20;CX3CL1;JUN;LIF;PTGS2;VCAM1
PI3K-Akt 信号通路	1.80	0.530	COL6A1;COL6A2;G6PC1;LAMC2;LPAR6;MAGI2;NR4A1;PIK3R5;PPP2R2C;SGK1
流体剪切应力与动脉粥样硬化	2.44	0.530	GSTA2;GSTA3;HMOX1;JUN;KLF2;VCAM1
视黄醇代谢	3.17	0.530	ADH1C;ADH4;CYP26A1;UGT1A6
细胞因子-细胞因子受体互作	1.90	0.530	CCL20;CRLF2;CX3CL1;CXCL12;CXCL8;IL15RA;IL1RN;LIF;TNFRSF9
金黄色葡萄球菌感染	2.69	0.530	ITGAM;KRT15;KRT19;KRT23;PTAFR
轴突导向	2.17	0.539	ABLM2;CXCL12;EPHA1;EPHB2;FES;PAK3;SEMA5A
铁死亡	3.80	0.539	SLC3A2;HMOX1;CP
mRNA 监测途径	2.50	0.579	MSTRG.15638;NXF2;NXF2B;PABPC1L;PPP2R2C
卟啉与叶绿素代谢	3.49	0.591	CP;HMOX1;UGT1A6

## 2.5 Lenva 耐药细胞存在铁死亡抵抗

10  $\mu\text{mol/L}$  Lenva 处理细胞 48 h,与 PC 相比,LRC 活力明显增加,结果如图 5A 所示。铁死亡保护蛋白 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达增加,结果如图 5B 所示。而细胞 ROS 含量显著降低,结果如图 5C 所示。

电镜结果显示,经 Lenva 处理后的 PC,细胞核大小无明显变化,但线粒体体积缩小,外膜断裂,嵴数量减少,线粒体呈典型的铁死亡特征,而经 Lenva 处理后的 LRC 线粒体改变明显减轻,结果如图 5D 所示。



注:A.LRC 和对应的 PC 的相对活力分析;B.LRC 和 PC 的 SLC7A11 和 GPX4 的表达分析;C.LRC 和 PC 的 ROS 含量分析;D.透射电镜观察 LRC 和 PC 线粒体形态;与 PC 组比较,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 5 Lenva 耐药细胞的铁死亡抵抗分析

## 3 讨论

Lenva 作为一个多靶点激酶抑制剂,其主要作用靶点包括成纤维细胞生长因子受体、血管内皮生长因子受体、血小板衍生生长因子受体  $\alpha$  及原癌基因 RET 和 KIT 等<sup>[10-12]</sup>。尽管未经治疗的晚期 HCC 患者应用 Lenva 治疗的总生存率不低于应用索拉非尼治疗,但由于肿瘤自身的异质性,HCC 患者在治疗过程中会逐渐出现 Lenva 耐药<sup>[13]</sup>。因此,目前迫切需要深入研究 Lenva 耐药的分子机制。本研究采用梯度诱导法在体外成功构建了 Lenva 耐药 HCC 细胞系,为开展 Lenva 耐药相关研究提供了条件。

RNA-seq 是一种基于第二代测序技术、可对细胞或组织等生物样本进行海量的生物信息学分析技术,广泛用于转录组表达和 RNA 功能研究<sup>[14]</sup>。本研究采用 RNA-seq 技术对 LRC HCC 细胞及其对应

的 PC 进行生物信息学分析,共发现 285 个差异表达基因,其中 88 个基因表达上调,197 个基因表达下降,并对这些差异基因进行筛选和富集。KEGG 通路富集显示,LRC 中存在铁死亡的调控失衡;差异表达基因筛选显示,铁死亡相关基因 SLC3A2、HMOX1 上调,而 CP 下调,提示铁死亡可能在 HCC 细胞获得 Lenva 耐药过程中发挥重要作用。

铁死亡受多种信号通路调控,其中胱氨酸/谷氨酸逆向转运体 System  $\text{Xc}^-$ /GSH/GPX4 最为经典。System  $\text{Xc}^-$  由功能亚基 SLC7A11 和伴侣亚基 SLC3A2 以二聚体形式嵌于细胞膜上,通过将胞外胱氨酸转运入胞内参与合成谷胱甘肽。谷胱甘肽过氧化物酶 4 则利用谷胱甘肽降低脂质 ROS 的产生,从而发挥抵抗铁死亡的作用<sup>[15]</sup>。本研究实验结果显示,LRC 与 PC 比较,SLC7A11 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 蛋白表达都上调,细胞中 ROS 含量降低;电镜结

果也揭示,LRC的线粒体出现铁死亡耐受的形态学变化。这些结果表明肝癌细胞的 Lenva 耐药伴随着铁死亡抵抗。

与另一 HCC 靶向药物索拉菲尼类似,Lenva 也已被证实,可诱导肿瘤细胞发生铁死亡,但肿瘤细胞对 Lenva 耐药过程中为何会出现铁死亡耐受,至今尚不得而知<sup>[16-17]</sup>。事实上,索拉菲尼在诱导肿瘤细胞发生铁死亡的过程中,自身也会激活细胞内的铁死亡抵抗机制<sup>[18]</sup>。相关研究<sup>[19]</sup>结果表明,铁死亡诱导剂索拉菲尼可通过激活 P62-Keap1-NRF2 信号途径增加肝癌细胞的铁死亡抗性,Lenva 是否也有类似的铁死亡抵抗作用值得深入研究。分子靶向药物的出现可一定程度改善肿瘤患者的预后,但随之而来的肿瘤耐药则是面临的新问题<sup>[20]</sup>。肿瘤耐药是多因素参与的复杂过程,综合性治疗则有最大可能降低 Lenva 耐药的不利影响<sup>[21]</sup>。靶向铁死亡是目前治疗肿瘤的不错选择,但其在应对肿瘤发生发展以及肿瘤耐药过程中能发挥多大的作用,这仍值得深入探讨<sup>[22]</sup>。

#### 4 结论

肝癌细胞的 Lenva 耐药涉及多个基因和信号途径,其中铁死亡抵抗可能是其引起耐药的关键。本研究为靶向调控肿瘤细胞的铁死亡、逆转肝癌细胞的 Lenva 耐药提供了实验数据。

#### 参考文献

- [1] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018,391(10127):1301-1314.
- [2] ZHOUM G, WANG H D, ZENG X Y, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. *Lancet*, 2019,394(10204):1145-1158.
- [3] KUDO M, FINNR S, QIN S K, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial[J]. *Lancet*, 2018,391(10126):1163-1173.
- [4] DIXONS 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.

- [5] YANH F, ZOU T, TUO Q Z, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021,6(1):49.
- [6] JAKARIAM, BELAIDI A A, BUSH A I, et al. Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2021,159(5):804-825.
- [7] WUX G, LI Y, ZHANG S C, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease[J]. *Theranostics*, 2021,11(7):3052-3059.
- [8] 牛爽,何忠时,曾炼,等.p53介导的铁死亡在调控人结肠癌顺铂耐药中的作用及机制[J].*中国病理生理杂志*, 2023,9(1):9-19.
- [9] ZHANG C, LIU X Y, JIN S D, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2022,21(1):47.
- [10] HUB Y, ZOU T T, QIN W, et al. Inhibition of EGFR overcomes acquired lenvatinib resistance driven by STAT3-ABCB1 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2022,82(20):3845-3857.
- [11] JINH J, SHI Y P, LV Y Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib[J]. *Nature*, 2021,595(7869):730-734.
- [12] SHI T T, IWAMA H, FUJITA K, et al. Evaluating the effect of lenvatinib on sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(23):13071.
- [13] CHEN Y C, SHANG H T, WANG C Y, et al. RNA-seq explores the mechanism of oxygen-boosted sonodynamic therapy based on all-in-one nanobubbles to enhance ferroptosis for the treatment of HCC[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022,17:105-123.
- [14] 葛树杰,胡永全,周晓静,等.GPX4介导铁死亡在上皮性卵巢癌顺铂耐药细胞中的作用[J].*华夏医学*, 2023,36(4):42-46.
- [15] ISEDA N, ITOH S, TOSHIDA K, et al. Ferroptosis is induced by lenvatinib through fibroblast growth factor receptor-4 inhibition in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2022,113(7):2272-2287.
- [16] XUF L, WU X H, CHEN C, et al. SLC27A5 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by downregulating glutathione reductase[J]. *Cell Death*



- Dis, 2023,14(1):22.
- [17] SUN X F, NIU X H, CHEN R C, et al. Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis[J]. *Hepatology*, 2016,64(2):488-500.
- [18] SUN X F, OU Z H, CHEN R C, et al. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2016, 63(1):173-184.
- [19] TANG W W, CHEN Z Y, ZHANG W L, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020,5(1):87.
- [20] GUO J H, ZHAO J J, XU Q R, et al. Resistance of lenvatinib in hepatocellular carcinoma [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2022,22(11):865-878.
- [21] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons; the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021,18(5):280-296.
- [22] MOU Y H, WANG J, WU J C, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019,12(1):34.
- [收稿日期:2024-02-01]
- [责任编辑:涂剑,向秋 英文编辑:周寿红]