原著

ヘム誘導体が単球 / マクロファージの ROS 産生と細胞死を誘導する機構の検討

井本しおん[1)]　澤村　暢[1)]　溝越　祐志[1)]　渋谷　雪子[1)]
澤田　浩秀[1)]　西郷　勝康[2)]　河野　麻理[3)]

Mechanism of hemin-induced ROS production and cell death in monocyte/macrophage

Shion IMOTO[1)], Tohru SAWAMURA[1)], Yuji MIZOKOSHI[1)], Yukiko SHIBUYA[1)], Hirohide SAWADA[1)], Katsuyasu SAIGO[2)], and Mari KONO[3)]

要　　旨

ヘム誘導体がマクロファージの細胞死を誘導する機構についてはまだ不明な点が多い。本研究の目的は、ヘム誘導体ヘミンが単球 / マクロファージの ROS 産生と細胞死を誘導する機構の解明である。ヒト単球系培養細胞 THP-1を用いて、ヘミンによる ROS 産生と細胞死をフローサイトメトリー（FCM）等で測定した。ヘミンは濃度依存的に細胞死と ROS 産生を誘導した。抗酸化剤 NAC は ROS 産生と細胞死を抑制し、ミトコンドリア選択的抗酸化剤 MitoTEMPO は細胞死のみを抑制した。NADPH oxidase（Nox）阻害剤では、DPI は ROS 産生と細胞死を抑制したが、アポサイニンと Nox 特異的阻害剤 VAS2870は ROS 産生も細胞死も抑制しなかった。以上の結果から、1）ヘミンによる ROS 産生には、複数経路が関与していること、2）ヘミンによる細胞死誘導にはミトコンドリアでの ROS 作用が重要であること、を示している。

キーワード：ヘミン、単球／マクロファージ、THP-1, 細胞死、ROS

SUMMARY

Hemin, heme-derived molecule, can induce reactive oxygen species (ROS) production and cell death. However, effects of hemin on monocyte/macrophage remain unclear. The purpose of this study was to understand the mechanisms of ROS production and cell death induced by hemin in monocyte/macrophage. Human monocytic THP-1 cells were treated with hemin and cell death and ROS production were measured by flow cytometry. Hemin dose-dependently induced cell death and ROS production. The anti-oxidant N-acetyl cysteine (NAC) suppressed both hemin-induced ROS production and cell death. The mitochondria-selective anti-oxidant MitoTEMPO suppressed hemin-induced cell but not ROS production. Among the NADPH oxidase inhibitors, diphenyleneiodonium chloride (DPI), apocynin, and VAS2870, only DPI suppressed hemin-induced ROS production and cell death. These results indicate

1）保健科学部医療検査学科
2）姫路獨協大学薬学部
3）シスメックス株式会社学術研究部

that the NADPH oxidase pathway is not the main pathway for hemin-induced ROS production, and that ROS-producing reactions in mitochondria are important for hemin induced cell death.

Key words : hemin, monocyte/macrophage, THP-1, cell death, ROS

緒言

溶血や筋融解等によって細胞外へ放出されたヘム蛋白からは、ヘム誘導体のヘムおよびヘミンが遊離してくる。ヘム／ヘミンは血管内皮細胞等を傷害し炎症を惹起して溶血性疾患、出血・梗塞、敗血症の重篤化に関与している[1) 2)]。

単球・マクロファージは、炎症反応では自然免疫反応と獲得免疫反応を橋渡しする重要な役割を担っているだけでなく、老化赤血球の貪食、ヘモグロビンやヘムの取り込み、細胞内貯蔵の放出など、ヘム代謝、鉄代謝においても中心的役割を担っている[1) 3) 4)]。したがって、単球・マクロファージに対するヘム／ヘミンの役割を解明することは、ヘム／ヘミンの関与する様々な疾患・病態の治療方法を開発する上でも重要と思われる。我々は、ヘミンが単球・マクロファージの ROS 産生と細胞死をどのように誘導するのかを、ヒト単球系培養細胞株 THP-1を用いて検討した。

材料及び方法

試薬：

ヘミン（Sigma-Aldrich）

ROS 指示薬；CM-H2DCFDA（Invitrogen）

細胞死測定用試薬；Annexin V-FITC キット（Beckman Coulter）

酸化剤；N-acetyl cysteine（NAC; Sigma-Aldrich）、Mito-TEMPO（Sigma-Aldrich）

NADPH oxidase 阻害剤；diphenyleneiodonium chloride（DPI; Cayman）、アポサイニン（Calbiochem）、VAS2870（Sigma-Aldrich）

細胞培養：

ヒト単球系培養細胞株 THP-1（DS ファーマバイオメディカル社）を、10% 牛胎児血清（FBS; HyClone）加 RPMI1640（Gibco; 以下 RPMI と略）を培養液として、37℃ 5% CO_2インキュベーターで培養を継続した。

THP-1に対するヘミン処理：

血清蛋白の効果を見る実験を除いて、無血清条件で実験を行った。FBS を除去するため0%FBS RPMI で2回洗浄後、細胞濃度1×10^6/ml に調整し、24ウェルプレートに1ml ずつ分注した。

ヘミンは、ストック液（5mmol/L in DMSO　冷凍庫保存）を、所定濃度となるよう各ウェルに添加し、所定時間を37℃ 5% CO_2 インキュベーターで処理した。

血清蛋白濃度の影響検討では、0%FBS RPMI で2倍濃度の細胞浮遊液を作成し、2倍濃度の血清蛋白を含む RPMI と等量等量混合することで、目的とする蛋白濃度の細胞浮遊液を作成した。

各種阻害剤処理

抗酸化剤（NAC, MitoTEMPO）、NADPH 阻害剤（DPI、アポサイニン、VAS2870）は、いずれも DMSO でストック液を作成し冷凍庫保存し、用事解凍した。いずれもヘミン添加前に前処理として投与した。ストック液を所定濃度となるよう各ウェルに添加し、所定時間を37℃ 5% CO_2 インキュベーターで処理し、所定時間後にヘミンを添加した。

FCM による細胞死の測定：

ヘミン処理終了後、細胞浮遊液を PBS または0%FBS RPMI で1回洗浄。Annexin-V-FITC と PI を使用説明書通りの手順で添加後、FCM（FACSCalibur, BD 社）で測定した。

普通染色標本の作製：

ヘミン処理後に洗浄した細胞浮遊液の一部を遠心操作にて10倍に濃縮し、スライドグラスに塗抹・風乾後、May-Giemsa 染色し、細胞の形態変化を観察した。

FCM による ROS の測定：

ヘミン処理終了後、細胞浮遊液を0%FBS RPMI で1回洗浄して24ウェルプレートに戻した。ROS 指示薬（CM-H2DCFDA）を添加し、37℃・5%CO_2で30分間反応させた後、PBS または O%FBS RPMI で1回洗浄し、FCM で測定した。

位相差・蛍光顕微鏡による観察：

ROS を FCM で測定する検体の一部を、スライドグラスに滴下し、カバーグラスをかぶせて位相差・蛍光顕微鏡で観察した。

統計学的解析

実験データの比較における有意差検定は、Excell の Student's t-test を用いて実施し、$p<0.05$ を有意差有りと判定した。

結果

ヘミンによる細胞死の誘導

普通染色標本観察では、ヘミン処理により細胞形態を維持した細胞数の減少と細胞残影の増加が認められた（Fig. 1 a)-c)）。細胞残影の比率はヘミン10μM よりもヘミン30μM の方が多い傾向が認められた。

FCM による測定では、ヘミン処理後に THP-1は PI 陽性 Annexin-V 陰性のネクローシスパターンを示した（Fig. 1 d)）。ネクローシス細胞の比率はヘミン濃度が高いほど、また処理時間が長いほど増加を示した（Fig. 1 e)）。

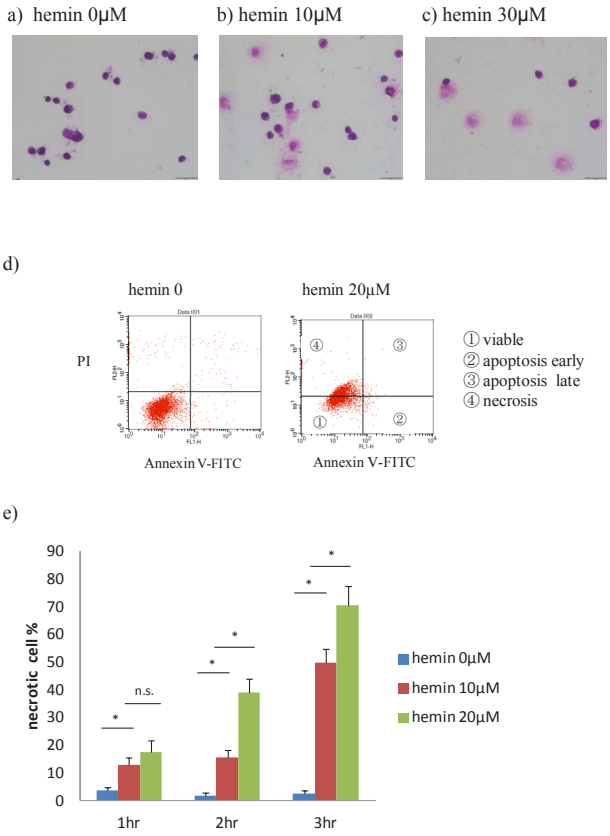


Figure 1. hemin-induced cell death ヘミンによる細胞死の誘導

a)〜c) ヘミン2時間処理後の THP-1細胞を May-Giemza 染色し顕微鏡で観察した（倍率400倍）。ヘミン処理による細胞残影像の増加が認められる。
d) ヘミン2時間処理後、THP-1細胞を Annexin V-FITC と PI と反応させ、FCM で測定。
　ヘミンによる細胞死は Annexin V - PI+（分画④）のネクローシスパターンを示した。
e) ヘミン濃度／処理時間と細胞死との関連
　細胞死比率（ネクローシス%）は、ヘミン濃度および処理時間依存性に増加した。
　棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は $p<0.05$ を示す。n.s. は有意差無し（$p>0.05$）を示す。

ヘミンによる ROS 産生の誘導

ヘミン処理しなかった細胞は蛍光ヘミン処理後に ROS 指示薬を添加した細胞は、蛍光顕微鏡で明瞭に蛍光を観察できたが、ヘミン処理無しの細胞は同一条件下では蛍光を観察できなかった（Fig. 2 a)-f))。

FCM では、ヘミン処理後の蛍光ピークは、無処理の蛍光ピークに比べ5～10倍増加し、ヘミン濃度が高いほど増強した（Fig. 2 g), h))。ROS 産生を示す蛍光強度の増加は、ヘミン処理2時間が最大となり、ヘミン処理3時間では2時間処理に比べ減弱した（Fig. 2 h))。

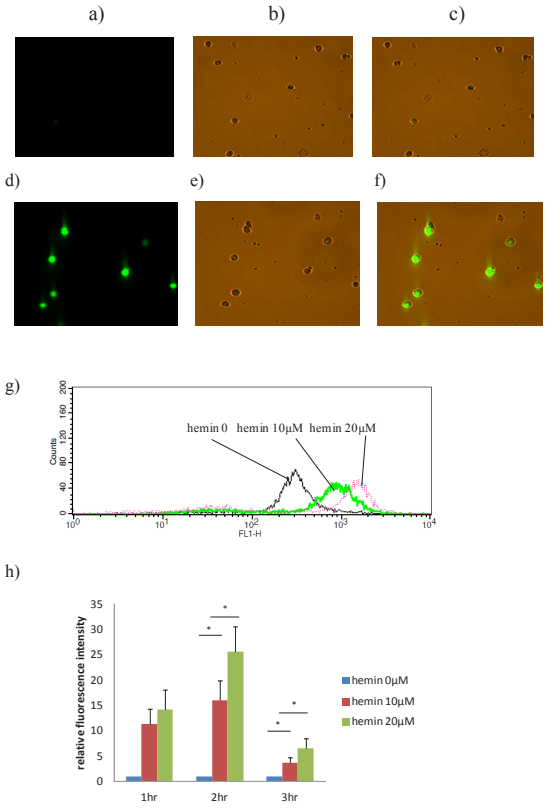


Figure 2. hemin-induced ROS production ヘミンによる ROS 産生の誘導
ヘミン処理後の THP-1細胞に ROS 指示薬（CM-H2DCFDA）を添加し、蛍光・位相差顕微鏡および FCM で ROS 産生を測定した。

a)～c) ヘミンなし（陰性コントロール）。a) は蛍光顕微鏡、b) は位相差顕微鏡、c) は a) b) の重ね合わせ像。
d)～f) ヘミン20μ mol/l 2時間処理。d) は蛍光顕微鏡、e) は位相差顕微鏡、f) は d) e) の重ね合わせ像。
g) ROS 産生を蛍光強度を指標に FCM で測定した。hemin 濃度の増加により蛍光ピークが増強（右にシフト）した。
h) ヘミン濃度／処理時間と ROS 産生との関連
　ROS 産生（蛍光強度）は、ヘミン濃度依存性に増加を示したが、処理時間では2時間をピークに以後は減弱した。棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は $p<0.05$ を示す。

ヘミンによる細胞死・ROS 産生誘導に対する血清蛋白の影響

上述の通り、無血清条件ではヘミンによる細胞死誘導および ROS 産生誘導を観察できた。次に、FBS あるいは牛血清アルブミン（BSA）存在下ではどうなるかを検討した。

FBS 5% 存在下では、ヘミンによる ROS 産生と細胞死誘導は、いずれもほぼ完全に抑制された（Fig. 3)。

FBS 中のアルブミン濃度を生化学検査機器（FURUNO CA-90）でブロモクレゾールパープル（BCP）法にて測定したところ、アルブミン濃度は 2.32g/dl であった。5% FBS 中のアルブミン濃度に相当する0.1% BSA　存在下では、FBS 5% 存在下と同様、ヘミンによる ROS 産生も細胞死誘導もほぼ完全に抑制された（Fig. 3)。

ヘミンによる細胞死・ROS 産生誘導に対する抗酸化剤の影響

ヘミンによる ROS 産生と細胞死誘導に、抗酸化剤がどのような影響を及ぼすかを検討した。

抗酸化剤 NAC は、ヘミンによる細胞死も ROS 産生も抑制したが、ROS 産生抑制の程度に比べ、細胞死抑制の程度は弱かった（Fig. 4 a), b))。

ミトコンドリア選択的抗酸化剤である MitoTEMPO は、ヘミンによる細胞死を抑制し、その作用は濃度依存的であった（Fig.4 c))。しかし、ROS 産生に対する抑制効果は、MitoTEMPO の濃度を高めても認められなかった（Fig.4 d))。

ヘミンによる細胞死・ROS 産生誘導に対する NADPH oxidase の影響

細胞質における ROS 産生の主要経路である NADPH oxidase（Nox）を阻害することによって、ヘミンによる ROS 産生誘導が抑制されるかどうか、また細胞死誘導にどのような影響を与えるかを、3種類の Nox 阻害剤、DPI、アポサイニン、VAS2870、を用いて検討した。

DPI は、ヘミンによる ROS 産生を抑制するとともに、細胞死誘導に対する強力な抑制作用を示した

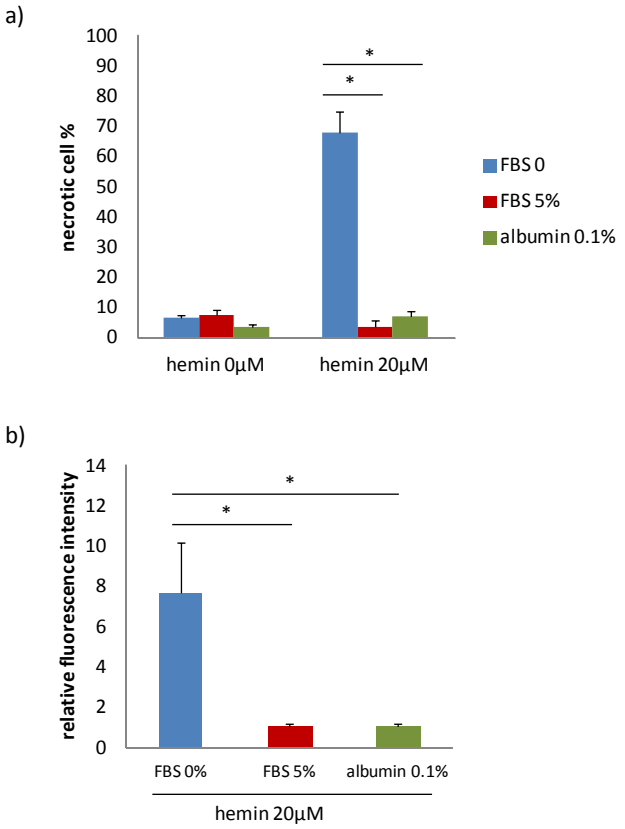


Figure 3. Effects of serum protein on hemin-induced cell death and ROS production　血清蛋白がヘミンによる ROS 産生・細胞死誘導に及ぼす影響

a) THP-1細胞を、FBS 0%、FBS 5%、または牛アルブミン0.1%存在下にてヘミン0 または20μ mol/l で2時間処理し、細胞死（ネクローシス%）を測定した。FBS 0% ではヘミンにより細胞死が誘導されたが、FBS 0% あるいはアルブミン0.1%存在下では、ヘミンによる細胞死誘導は完全に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。
b) 上記と同様の条件で、ヘミンによる ROS 産生誘導を測定した。FBS 0% ではヘミンにより ROS 産生が誘導されたが、FBS 0% あるいはアルブミン0.1%存在下では、ヘミンによる ROS 産生誘導は完全に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。

(Fig.5 a), b))

アポサイニンは、ヘミンによる ROS 産生誘導を抑制せず、細胞死抑制効果も示さなかった（Fig. 5 c), d))。

Nox 特異的阻害剤である VAS2870は、濃度を高めても、ヘミンによる ROS 産生誘導にも細胞死誘導にも抑制作用を示さなかった（Fig. 5 e), f))。

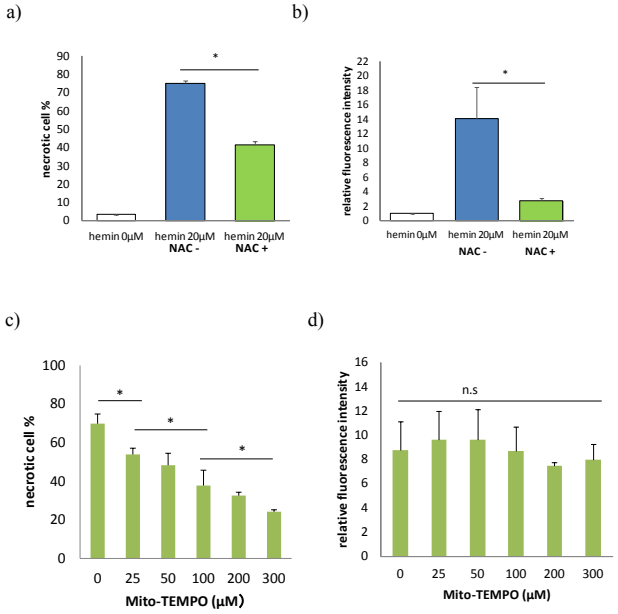


Figure 4.　Effects of antioxidants on hemin-induced cell death and ROS production　抗酸化剤がヘミンによる ROS 産生・細胞死誘導に及ぼす影響

a) THP-1細胞を、抗酸化剤 NAC 0 または10mmol/l で1時間処理後に ヘミン0 または20μ mol/l で2時間処理し、細胞死（ネクローシス%）を測定した。ヘミンによる細胞死は NAC 前処理によって有意に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。
b) 上記（a)）と同様の条件で、ROS 産生誘導を測定した。ヘミンによる ROS 産生誘導は NAC 前処理によって有意に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。
c) THP-1細胞を、ミトコンドリア選択的抗酸化剤 MitoTEMPO 0～300μ mol/l で1時間処理後に ヘミン20 μ mol/l で2時間処理し、細胞死（ネクローシス%）を測定した。ヘミンによる細胞死は MitoTEMPO 濃度依存性に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。
d) 上記（c)）と同様の条件で、ROS 産生誘導を測定した。高濃度の MitoTEMPO（300μ mol/l）でもヘミンによる ROS 産生誘導は抑制されなかった。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
n.s. は有意差無し（not significant; p>0.05）を示す。

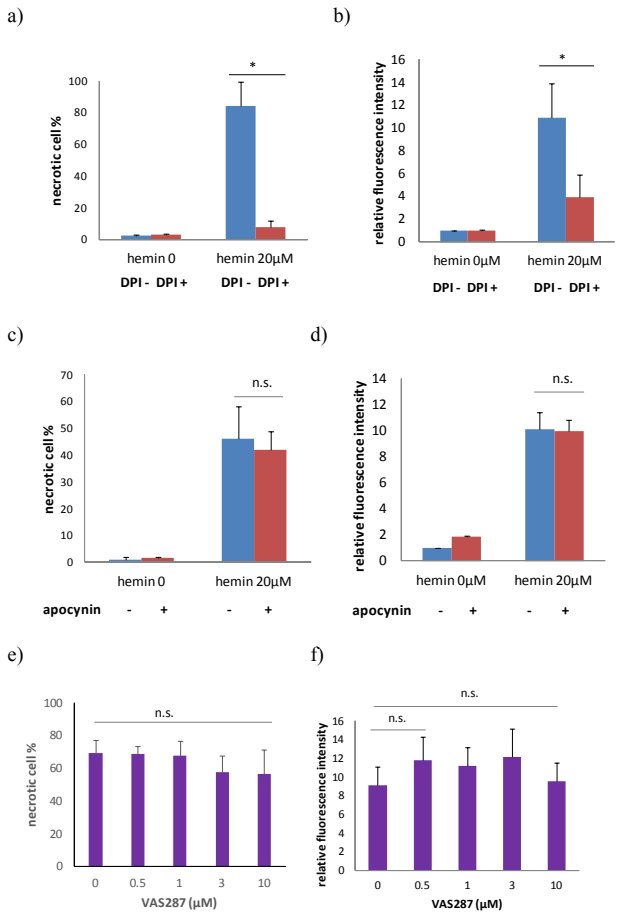


Figure 5.　Effects of NADPH oxidase inhibitors on hemin-induced cell death and ROS production　NADPH oxidase 阻害剤がヘミンによる ROS 産生・細胞死誘導に及ぼす影響

a) THP-1細胞を、NADPH oxidase（Nox）阻害剤 DPI 0 または20μ mol/l で1時間処理後に ヘミン0 または20μ mol/l で2時間処理し、細胞死（ネクローシス%）を測定した。ヘミンによる細胞死は DPI 前処理によって有意に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。
b) 上記（a)）と同様の条件で、ROS 産生誘導を測定した。ヘミンによる ROS 産生誘導は DPI 前処理によって有意に抑制された。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
＊は p<0.05 を示す。
c) THP-1細胞を、Nox 阻害剤アポサイニン0 または100μ mol/l で1時間処理後に ヘミン20μ mol/l で2時間処理し、細胞死（ネクローシス%）を測定した。ヘミンによる細胞死誘導は、アポサイニン前処理では抑制されなかった。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
n.s. は有意差無し（not significant;　p>0.05）を示す。
d) 上記（c)）と同様の条件で、ROS 産生誘導を測定した。ヘミンによる ROS 産生誘導は、アポサイニン前処理では抑制されなかった。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
n.s. は有意差無し（not significant; p>0.05）を示す。
e) THP-1細胞を、Nox 特異的阻害剤 VAS2870 0～10μ mol/l で1時間処理後に ヘミン20μ mol/l で2時間処理し、細胞死（ネクローシス%）を測定した。ヘミンによる細胞死は、高濃度の VAS2870（10μ mol/l）でも抑制されなかった。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
n.s. は有意差無し（not significant; p>0.05）を示す。
f) 上記（e)）と同様の条件で、ROS 産生誘導を測定した。ヘミンによる ROS 産生誘導は、高濃度の VAS2870（10μ mol/l）でも抑制されなかった。
棒グラフの数値は3回行った実験の平均値である。バーは標準偏差を示す。
n.s. は有意差無し（not significant; p>0.05）を示す。

考察

ヘミンによる ROS 産生、細胞死（ネクローシス）誘導作用は報告論文によって異なり、一定の見解が得られていない。Bozza らのグループは、マウスの腹腔内マクロファージを用いて in vitro でヘムによる細胞死、ROS 産生を誘導しているが[3]、Kwon らの報告ではヘミンは単独では細胞死、ROS 産生も誘導しない[5]。本研究では、ヘミンによる ROS 産生、細胞死（ネクローシス）は無血清条件下では容易に誘導できたが、FBS 5% 存在下ではヘミンの誘導作用が完全に抑制されることがわかった。Bozza のグループは無血清で、Kwon らは10% FBS 条件で測定している。ヘミンの作用が報告論文によって異なる原因の一つは、in vitro で用いる血清濃度の違いによる可能性が考えられる。組織液における蛋白濃度は血漿より低濃度（例えば脳脊髄液の蛋白濃度（15～45mg/dl）は血漿の1/200以下）である。我々は無血清条件で実験することによりヘミンの作用を短時間で解析できたが、得られた結果は血管外でのヘミンの作用を反映していると考えている。

ヘミンは THP-1の細胞死を濃度および処理時間依存性に誘導したが、細胞死のパターンは Annexin V 陰性 PI 陽性のネクローシスパターンを示した（Fig. 1d)）。ネクローシスパターンを示す原因として、ヘミンは細胞膜脂質に結合できるため[1)~3)]、細胞膜の透過性を変化させる可能性を推定している。

ROS 産生と細胞死誘導との関連については、抗酸化剤 NAC によってヘムの ROS 産生と細胞死誘導が共に抑制されたことから、ROS による酸化作用が細胞死を誘導することが示唆された。しかし、ミトコンドリア選択的抗酸化剤 MitoTEMPO では ROS 産生は阻害せず細胞死を阻害したことから、ヘミンによる細胞死誘導には、ROS 産生の細胞内総量ではなくミトコンドリアでの ROS の作用が重要であると推定している。

細胞内の ROS 産生には多くの経路があるが、主要なものは、NADPH オキシダーゼ（NADPH oxidases；Nox)、キサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase)、非共役的 NO 合成酵素 (uncoupled NO synthase)、ミトコンドリア電子伝達系（mitochondrial electron transport chain）の４つである[6]。このうち主要のものは Nox とミトコンドリアであり、両者の相互作用（crosstalk）の重要性が注目されている[6]。本研究で Nox 阻害剤がヘミンによる ROS 産生と細胞死誘導に及ぼす影響を検討した結果、DPI だけがヘミンによる ROS 産生と細胞死誘導を抑制でき、アポサイニンおよび Nox 特異的阻害剤 VAS2870では ROS 産生も細胞死も抑制できなかった。DPI は Nox 以外の ROS 産生経路にも阻害作用を示す[7]。したがって、ヘミンによる ROS 産生・細胞死を阻害するには複数の ROS 産生経路を阻害する必要があること、Nox 単独阻害では他の経路を償的に亢進する可能性があること、を示唆している。

以上より、ヘミンによる THP-1の細胞死誘導には複数の ROS 産生経路が関与し、特にミトコンドリアでの ROS あるいは酸化作用が重要な役割を果たしていると考えられる。なお、ROS 産生が3時間処理では2時間処理に比べ減弱する理由としては、死細胞比率の増加、ROS 産生反応における基質の枯渇などが考えられる。

これまでに我々は、正常ヒト好中球を用いて、ヘミンが好中球のクロマチン網を細胞外に放出し (neutrophil extracellular traps: NETs)、細胞死 (NETosis) を誘導することを別論文で報告している[8) 9)]。今回の研究はヒト単球・マクロファージに対するヘミンの作用を明らかにすることであるが、THP-1という培養細胞株を用いたものであるため、正常ヒト単球ではヘムがどのような作用を示すのか検討を進める必要がある。

また、ヘミンは細胞内でヘムオキシゲナーゼ -1 (HO-1) によって２価鉄イオンと一酸化炭素、ビリベルジンに分解される（1,2,4)。ヘミンによる ROS 産生において HO-1の作用で細胞内に遊離する２価鉄イオンがどの程度の重要性を持つのかは興味深い課題である。また、ヘミンによる細胞死誘導が、鉄依存性の新たな細胞死経路として”ferroptosis”という概念が最近提唱されている[10) 11)]。しかし、ferroptosis における鉄の実質的な作用については、まだ不明である。ヘミンによる細胞死の解析を通じて、ferroptosis における鉄の役割について検討を進めていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、平成27年度神戸常盤大学テーマ別研究「ヘム誘導体が単球 / マクロファージの ROS 産生と細胞死を誘導する機構の検討」として研究助成を受けました。

本研究の進行を支えてくれた本年度卒業研究井本ゼミ学生；市田裕之、打浪祥子、比嘉楓奈子、槇原裕樹、村原明里、山田有希子の諸氏、および井本ゼミの卒業生達に深謝いたします。

文献

1. Dutra FF, Bozza MT.　Heme on innate immunity and inflammation.　Front Pharmacol. 2014 May 27;5:115
2. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM.　Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin

and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. Blood. 2013;121(8):1276-84.

3. Fortes GB, Alves LS, de Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, Souto-Padron T, De Rosa MJ, Kelliher M, Golenbock D, Chan FK, Bozza MT. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. Blood. 2012;119(10):2368-75.
4. Hull TD, Agarwal A, George JF. The mononuclear phagocyte system in homeostasis and disease: a role for heme oxygenase-1. Antioxid Redox Signal. 2014;20(11):1770-88.
5. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. Oncotarget. 2015;6(27):24393-403.
6. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. Free Radic Biol Med. 2011;51(7):1289-301.
7. Li Y1, Trush MA. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. Biochem Biophys Res Commun. 1998;253(2):295-9.
8. Kono M, Saigo K, Takagi Y, Takahashi T, Kawauchi S, Wada A, Hashimoto M, Minami Y, Imoto S, Takenokuchi M, Morikawa T, Funakoshi K. Heme-related molecules induce rapid production of neutrophil extracellular traps. Transfusion. 2014;54(11):2811-9.
9. Kono M, Saigo K, Takagi Y, Kawauchi S, Wada A, Hashimoto M, Sugimoto T, Takenokuchi M, Morikawa T, Funakoshi K. Morphological and flow-cytometric analysis of haemin-induced human neutrophil activation: implications for transfusion-related acute lung injury. Blood Transfus. 2013;11(1):53-60.
10. Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. Cell Mol Life Sci. 2016;73(11-12):2195-209.
11. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. Cell. 2012;149(5):1060-72.