

综述

药物诱导骨肉瘤细胞铁死亡的研究进展

柯义兵¹, 阿布都克热木·达吾提¹, 兰志杰¹, 郭浩然¹, 王勇平^{2*}(¹兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000; ²兰州大学第一医院骨科, 兰州 730000)

摘要: 骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是青少年最常见的骨科原发性恶性骨肿瘤, 具有高度侵袭性。近几十年来, 化疗药物的发展显著降低了骨肉瘤的复发转移率。但是由于化疗耐药性的产生, OS患者的生存率仍然处于平台期, 为此需要寻找新的治疗方式。铁死亡(ferroptosis)是一种新发现的不同于凋亡和自噬的铁依赖性的细胞死亡。研究表明, 诱导肿瘤细胞发生的铁死亡已经在乳腺癌、胃癌等多种癌症中发挥积极治疗作用。诱导骨肉瘤细胞铁死亡可能会是抗骨肉瘤的一种新的治疗方式。本文综述了铁死亡的过程以及药物通过诱导骨肉瘤细胞铁死亡发挥抗肿瘤作用的研究进展。

关键词: 骨肉瘤; 铁死亡; 抗肿瘤作用

Research progress of drug-induced ferroptosis in osteosarcoma cells

KE Yibing¹, ABUDUKEREMU Dawuti¹, LAN Zhijie¹, GUO Haoran¹, WANG Yongping^{2*}(¹The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;²Department of Orthopedics, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Osteosarcoma (OS) is the most common orthopaedic primary malignant bone tumor in adolescents, which is highly invasive. In recent decades, with the development of chemotherapy drugs, the recurrence and metastasis rate of osteosarcoma has been significantly reduced. However, due to the emergence of chemotherapy resistance, the survival rate of patients with OS is still at a plateau, so it is necessary to find a new treatment. Ferroptosis is a newly discovered iron-dependent cell death mechanism which is different from apoptosis and autophagy. Studies have shown that the way of inducing ferroptosis of tumor cells has played an active role in the treatment of breast cancer, stomach cancer and other cancers. Inducing ferroptosis of osteosarcoma cells may be a new treatment against osteosarcoma. This work reviewed the process of ferroptosis and the research progress of antitumor effects of drugs induced iron death in osteosarcoma cells.

Key Words: osteosarcoma; ferroptosis; antitumor effect

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种常见的恶性骨肿瘤, 主要发生在青少年, 尤其是15至19岁之间^[1]。传统的肿瘤治疗方法主要包括手术切除和化

疗。化疗是骨肉瘤治疗的重要组成部分, 目前, 化疗药物主要通过诱导凋亡来杀死骨肉瘤细胞^[2]。但随着化疗药物的广泛应用, 骨肉瘤细胞对化疗

收稿日期: 2024-05-01

基金项目: 甘肃省高等学校科研项目(2023CYZC-03); 兰州市人才创新创业项目(2021-RC-114); 兰州大学第一医院科研计划项目(LDYYYN 2021-12)

第一作者: E-mail: keyb17@lzu.edu.cn

*通信作者: E-mail: wangyp312@163.com

药物的耐药性不断增加,导致化疗疗效下降^[3]。因此,寻找新的治疗策略来克服化疗耐药性,提高治疗效果,成为当前研究的热点之一。为了克服骨肉瘤细胞对凋亡的抵抗,诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡是一种新的治疗策略。铁死亡是一种与凋亡不同的细胞死亡方式,与细胞内铁离子的稳态失衡有关^[4]。铁离子在细胞内起着重要的生物学作用,但铁离子的稳态失衡会导致细胞死亡。调节铁代谢相关的分子靶点,如铁载蛋白、铁转运蛋白和铁离子调节蛋白等,可以诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡。因此诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡可能成为一种新的治疗方式,为骨肉瘤患者带来新的希望。一些化合物也被发现具有诱导骨肉瘤细胞铁死亡的潜力,如铁螯合剂、铁离子释放剂和铁代谢酶抑制剂等。通过寻找新的治疗方式,探索诱导骨肉瘤细胞死亡的新模式和诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡的新型化合物,可以克服化疗耐药性,提高治疗效果,延长患者的生存期,这将是未来研究的方向。

1 铁死亡

铁死亡是一种铁依赖性的不同于凋亡和自噬的细胞死亡^[5],其特征是铁依赖、脂质过氧化增加,和随后的细胞膜损伤引起的受调控性细胞死亡^[6]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成和脂质异常是铁死亡的标志^[7]。铁死亡的细胞通常表现出坏死样形态变化^[8],包括质膜完整性的丧失、胞质细胞器肿胀和染色质浓缩以及线粒体外膜密度增加^[9,10]。线粒体作为ROS的重要来源之一,当细胞发生铁死亡时,线粒体在超微结构水平上通常表现为肿胀、膜密度增加、嵴的减少或缺失以及外膜破裂^[11,12]。当一个细胞发生铁死亡后可以快速传播到邻近细胞,使邻近细胞同样发生铁死亡^[13,14]。目前的研究已经表明,铁死亡在骨肉瘤中具有抗癌作用^[15,16]。

1.1 铁死亡脂质过氧化

脂肪酸包括饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)和多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFA)。脂肪酸在细胞中具有多种功能,不仅是细胞膜的组成成分,还可以作为能源物质提供能量,甚至作为信号分

子传递信息。脂质过氧化是铁死亡的重要特征之一,PUFA的产生是铁死亡过程中脂质过氧化的使动因素。PUFA合成的增加促进了随后的脂质过氧化及铁死亡过程,而MUFA会抑制铁死亡,因为PUFA和MUFA的结构对脂质过氧化的敏感性不同^[17]。PUFA的产生涉及脂肪酸的合成过程(图1),首先L-谷氨酰胺(L-glutamine)在细胞膜上的载体蛋白SLC38A1和SLC1A5介导下进入细胞,进入细胞后在谷氨酰胺酶2(glutaminase 2, GLS2)作用下产生谷氨酸(glutamate),这是谷氨酰胺进入胞质后的第一步反应。随后,谷氨酸通过谷氨酸草酰乙酸转氨酶1(glutamic-oxaloacetic transaminase 1, GOT1)转氨化产生 α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, α KG)^[18]。 α KG在线粒体内部通过氧化磷酸化产生ROS^[19],这一过程是铁死亡过程中ROS产生的重要一步。另一方面, α KG通过柠檬酸循环产生柠檬酸盐(citrate)后出线粒体,通过ATP-柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACL)在细胞质中产生乙酰辅酶A(acetyl-CoA, Ac-CoA)^[20],乙酰辅酶A经乙酰辅酶A羧化酶 α (ACACA)催化生成丙二酰辅酶A(malonyl-CoA)后在脂肪酸合成酶(fatty acid synthetase, FASN)的作用下合成PUFA,PUFA的过量产生会促进过氧化从而引起细胞发生铁死亡。在PUFA中花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和肾上腺素(adrenaline, AdA)是铁死亡中脂质氧化的主要底物^[21]。脂质过氧化发生在PUFA的双烯丙基位置^[22],其产物包括最初的脂质氢过氧化物(LOOHs)和随后的反应醛,如丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)和4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, HNE)。PUFA的过氧化需要酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long-chain family member, ACSL4)和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶3(Lyso-PL Acyltransferases 3, LPCAT3)。ACSL4是一种参与脂肪酸代谢的酶,并且ACSL4可作为铁死亡的生物标志物^[23]。ACSL4首先催化游离PUFA和CoA形成PUFA-CoA衍生物,并促进其酯化为磷脂,而LPCAT3随后催化PUFA-CoA和膜磷脂酰乙醇胺(PE)形成PUFA-PE^[24]。脂氧合酶(lipoxygenase, ALOX)将在随后介导PUFA-PE过氧化产生PUFA-PE-OOH^[25],在这一步反应中 Fe^{2+} 还可以通过增加ALOX的活性来促进

铁死亡。产生PUFA-PE-OOH是引起细胞膜氧化损伤的脂质过氧化反应最后一步。细胞膜的损伤最终导致细胞发生铁死亡。

1.2 铁死亡过程中的铁依赖性机制

细胞摄入的铁会通过Fenton反应直接生成过量的ROS(图1), 从而增加氧化损伤^[26]。Fenton反应是线粒体之外的又一ROS来源。除此之外, 细胞膜上的NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)可跨质膜运输电子产生超氧化物和ROS^[27], 在细胞发生铁死亡过程中, NOX的活性受到二肽基肽酶4(DPP4)的正向调节^[28]。首先, Fe^{3+} 与血清中的转铁蛋白(transferrin, TF)结合, 然后被细胞膜中的铁蛋白受体(transferrin receptor, TFRC)识别, TFRC在细胞膜上介导铁的运输^[29]。乳转铁蛋白(lactotransferrin, LTF)与TF相似, 也通过增加细胞铁摄入量来充当铁死亡的正性调节剂。先前的研究已经表明, TFRC表达的下调抑制了铁死亡^[30], 而过表达TFRC可以增加铁水平以增加铁死亡的敏感性^[31]。当 Fe^{3+} 进入细胞质后, 在内体中被STEAP3金属还原酶还原为 Fe^{2+} , 然后通过溶质载体家族11成员2(solute carrier family 11 member 2 Gene, SLC11A2)将 Fe^{2+} 从内体释放到胞质中。SLC11A2介导的 Fe^{2+} 从内体向细胞质的释放通过增加胞质内游离铁水平来促进铁死亡, SLC11A2表达量增加将会导致铁死亡^[32]。作为辅因子, Fe^{2+} 不仅可调节酶的活性, 还在氧化应激中发挥着重要作用^[33]。摄入的 Fe^{2+} 除了在细胞质中储存外, 还可通过Fenton反应产生ROS, 这也是铁死亡过程中诱发脂质过氧化损伤的关键一步。

1.3 铁死亡抑制系统

细胞自身存在抗氧化Xc-系统抑制铁死亡(图1), 诱导细胞铁死亡还可以通过抑制细胞内的抗氧化系统。细胞膜上的Xc-系统由两个核心组件组成: 轻链亚基SLC7A11和重链亚基SLC3A2。它们会将细胞外的胱氨酸(cystine)转入细胞内, 铁死亡激动剂erastin和RSL3都是通过作用于抗氧化系统发挥作用^[34], 其中erastin作用于SLC7A11^[35], 而RSL3则是通过抑制谷胱甘肽过氧化物4(glutathione peroxidase 4, GPX4)发挥作用^[36]。在SLC7A11上游, P53通过抑制SLC7A11的表达启动铁死亡过程^[37]。信号转导和转录激活因子3(STAT3)属于

STAT家族, 是参与炎症和肿瘤进展的重要转录因子^[38], 其位于P53的上游与P53相互作用并抑制P53^[39]。Cystine进入细胞后在谷氨酸-半胱氨酸连接酶(glutamate cysteine ligase, GCL)的作用下产生还原性物质谷胱甘肽(glutathione, GSH)。GSH作为一种重要的非酶抗氧化剂, 不仅能清除自由基, 还是由GPX4介导的还原反应的辅因子。细胞质内丁硫氨酸亚砷胺(L-buthionine-sulfoximine, BSO)对GCL发挥抑制作用, 也可促进铁死亡^[40]。GSH的下游是GPX4, GPX4可将潜在有毒的脂质氢过氧化物(LOOH)转化为无毒的脂质醇(L-OH)来抑制脂质过氧化引起的细胞膜损伤^[41]。使用erastin或直接使用GPX4抑制剂RSL3使GPX4失活, 最终可导致脂质过氧化诱导铁死亡。

2 药物治疗骨肉瘤研究现状

作为一种极具侵袭性的恶性肿瘤, 骨肉瘤给患者及其家庭带来沉重负担。传统化疗药物虽在一定程度上控制了病情发展, 但也面临着耐药性和严重不良反应等挑战。随着骨肉瘤药物治疗的研究不断推进, 诱导肿瘤细胞发生铁死亡在多种肿瘤细胞的治疗中已经展现出了积极作用。多种药物可通过诱导骨肉瘤发生铁死亡进而发挥抗肿瘤作用。除此之外, 中药活性成分、新型纳米技术及药物水凝胶在抗骨肉瘤中表现出了一定潜力。

2.1 诱导骨肉瘤细胞铁死亡相关药物

许多的新型化疗药物通过诱导肿瘤细胞铁死亡的方式发挥抗肿瘤作用。Shi等^[42]发现, 替拉扎明(tirapazamine, TPZ)可以抑制缺氧条件下骨肉瘤细胞的增殖和迁移, 缺氧条件下TPZ通过抑制SLC7A11诱导骨肉瘤细胞143B发生铁死亡。而OS细胞自身微环境具有低氧、低pH、高GSH水平的特征^[43], 因此TPZ可能是依靠OS细胞内的低氧环境发挥抗骨肉瘤作用的一种新型治疗药物。GPX4作为铁死亡过程中抗氧化系统的核心要素, 多数的药物通过抑制GPX4诱导肿瘤细胞铁死亡^[44,45]。在Lv等^[46]的研究中发现, β -苯乙基异硫氰酸酯(phenethyl isothiocyanate, PEITC)可在MG-63、143B骨肉瘤细胞内诱导包括铁死亡、自噬及凋亡在内的多种细胞死亡方式。PEITC不仅在肿瘤细胞内诱导产生高ROS环境, 更主要是通过抑制抗氧化

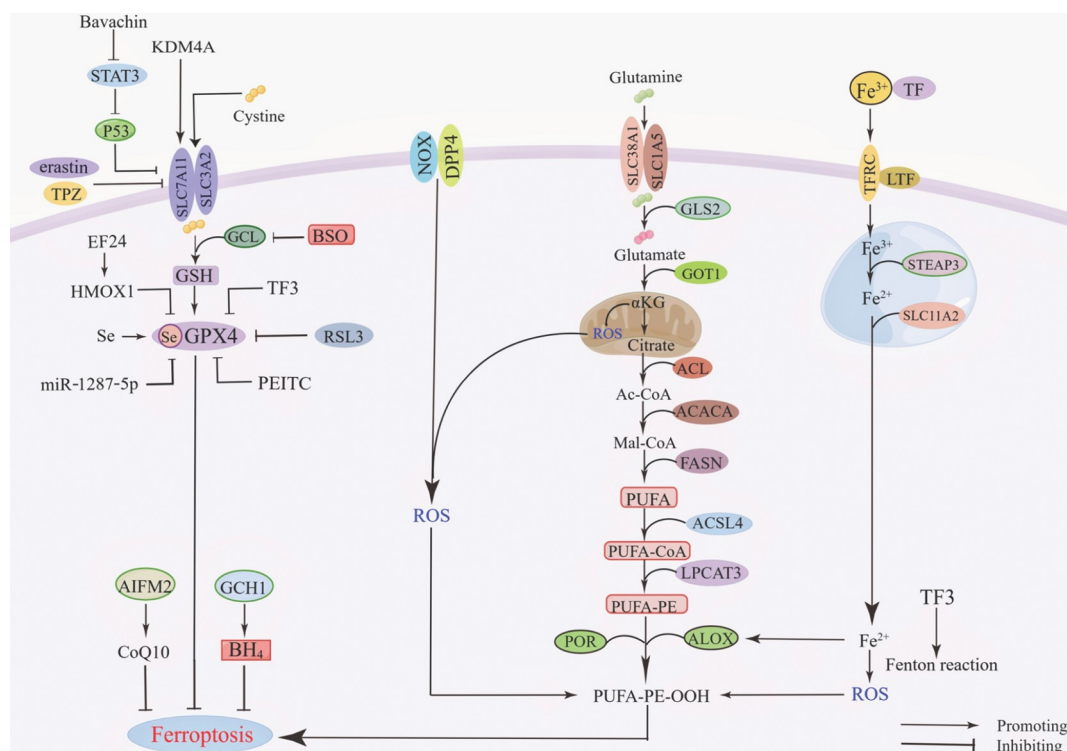


图1 细胞铁死亡分子机制、信号调控及药物诱导OS细胞铁死亡过程

系统GPX4来促进铁死亡过程的发生。PEITC在其他的研究中已被证明通过激活ROS相关的MAPK信号通路诱导K7M2鼠骨肉瘤细胞发生铁死亡^[47]。miR-1287-5p同样是通过抑制GPX4诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡^[48]。柳氮磺吡啶通常用于治疗类风湿性关节炎和炎症性肠病。柳氮磺胺吡啶通过抑制SLC7A11减少GSH的合成而促进多种肿瘤的铁死亡^[49]。Liu等^[50]发现,柳氮磺胺吡啶能有效地诱导小鼠OS细胞铁死亡,且与铁超载联合作用更为显著。除此之外,动物实验表明,组蛋白去甲基化酶4A(lysine specific demethylase 4A, KDM4A)通过促进SLC7A11的表达抑制铁死亡, KDM4A抑制剂诱导小鼠骨肉瘤细胞铁死亡的同时也显著降低了小鼠骨肉瘤的肺转移率^[51]。

中药活性成分同样在诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡过程中发挥重要作用。Luo等^[52]的研究发现,类黄酮化合物Bavachin(一类从补骨脂果实中提取的黄酮类化合物)降低了人OS细胞系MG63和HOS的线粒体膜电位并导致OS细胞中的线粒体收缩、膜密度增加和线粒体嵴减少。这些都符合铁死亡的形态学特征。在经Bavachin处理后, OS细胞内的

MDA的含量明显升高。除此之外,该研究还发现, Bavachin通过使STAT3失活以上调P53, P53随后下调SLC7A11来诱导OS细胞发生铁死亡。He等^[53]发现, 茶黄素3(theaflavin 3, TF3)不仅可以降低GPX4表达, 还可以通过激活Fe²⁺积累诱导的Fenton反应, 从而引发细胞铁死亡。在TF3作用24 h后, MG63细胞和HOS细胞线粒体呈现典型的铁死亡形态学特征, 具体表现为线粒体嵴变圆、萎缩, 膜密度增加, 线粒体嵴数量减少和缺失。其他研究表明, 姜黄素的合成类似物EF24除了提高细胞内铁离子水平, 还以剂量依赖性方式上调肿瘤细胞内一种细胞保护酶血红素加氧酶1(hemeoxygenase 1, HMOX1)的表达, 而HMOX1的过表达则会抑制骨肉瘤细胞系中GPX4的表达, 从而诱导骨肉瘤细胞铁死亡^[54]。青蒿素是青蒿的主要生物活性成分, 虽然青蒿素是一种传统的抗疟疾药物, 但其抗癌特性也广为人知^[55], 它可以调节OS中的相关信号通路, 抑制增殖和转移^[56]。Hosoya等^[57]在双氢青蒿素处理的D17犬OS细胞系的研究中检测到ROS产生, 并以剂量依赖的方式增加。Isani等^[58]的研究发现, 与未处理的OS细胞相比, 青蒿素干预的OS细

胞的铁浓度降低, 这可能有助于刺激不稳定的氧化还原活性铁池, 从而促进ROS沉积和铁死亡。因此, 青蒿素对OS的细胞毒性可能与铁死亡有关, 但仍需要后续的研究来证实。

2.2 其他相关药物

生物纳米技术具有增强疏水性药物的溶解性、靶向在肿瘤部位并蓄积以及减轻对正常组织的不良毒性等优点, 已被广泛用于开发新的抗癌药物, 以提高化疗的有效性。Zhang等^[59]设计了负载铁死亡诱导剂RAS选择性致死分子3(RSL3)的金纳米笼(C-RAuNC)用于治疗OS的化学抗性。金纳米笼具有优异的生物相容性、中空的内部和多孔的壁以及在近红外区域的高光热转换效率, 对癌细胞表现出有利的光热治疗效果, 并实现药物受控释放到靶位点。RSL3通过抑制GPX4诱导细胞发生铁死亡。而包裹在细胞膜上的金纳米笼作为纳米载体, 不仅可以实现靶向给药、药物控释, 还可以结合铁死亡来克服耐药性。

氧化锌纳米颗粒(ZnO NPs)介导的肿瘤细胞生长抑制主要是由于激活OS细胞中HIF-1 α /BNIP3/LC3B介导的线粒体自噬, 诱导 β -连环蛋白降解, 导致OS转移抑制^[60]。OS细胞的特征是CD44的表达, CD44通过与透明质酸(HA)的结合而被激活, 从而参与肿瘤的进展、耐药和转移^[61]。有研究表明, 负载唑来膦酸的纳米羟基磷灰石(NHA)表面修饰了羟基磷灰石(HA)和聚乙二醇(PEG)的100 nm无机纳米颗粒, 可以用于靶向OS细胞。HA-PEGnHA-唑来膦酸通过诱导局部炎症抑制体内OS细胞的增殖, 这种炎症可能导致肿瘤坏死。脂质体纳米粒用于保护体内装载的药物免受生物降解, 唾液霉素包埋的具有CD133和EGFR适配体的脂质聚合物, 以靶向CD133⁺ OS干细胞。该聚合物抑制OS细胞活性和携带OS的小鼠体内肿瘤生长^[62]。Fin56是一种新型铁死亡化学诱导剂, Fin56通过消耗GPX4蛋白和甲羟戊酸途径衍生的辅酶Q10的双重机制诱导铁死亡。Zhang等^[63]以精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)修饰介孔氧化铁负载Fin56为载体, 制备了一种新型纳米载体(FSR-Fin56)。利用RGD介导的靶向亲和力, FSR-Fin56可以实现货物的选择性聚集和准确地输送到癌细胞中。释放的Fin56触发了GPX4的降解, 而Fe³⁺耗尽了细胞内的GSH

池, 产生的Fe²⁺作为Fenton试剂。Fe²⁺介导的Fenton反应导致ROS迅速而显著地积累, 最终导致铁死亡。

生物材料, 特别是骨支架的发展已经成为骨修复和药物输送系统的良好支撑。在骨支架中, 具有吸水性的三维多孔网状凝胶(称为水凝胶)可用作治疗药物的载体。它们可以模仿细胞外基质, 提供药物治疗, 并改善骨再生。Peng等^[64]研究表明, 在携带Mg63的小鼠模型中, 包封在水凝胶中的药物可显著降低体内OS体积。这一结果表明, 水凝胶可以在肿瘤部位局部注射, 具有最小的侵入性、良好的生物安全性和低全身效应, 并且它们可以作为药物递送系统作为单一药剂或用于联合治疗。阿仑膦酸盐与奥沙利铂在mPEG45-PLV19热敏性水凝胶中的组合导致在体内小鼠模型中OS和肺转移的进展受到抑制^[65]。聚乙烯吡咯烷酮碘-I (povidone-iodine- I, PVP- I)是一种抗菌剂, 已在抗肿瘤治疗中流行, 并在癌症手术中用作冲洗液, 以消除残留癌细胞并防止局部复发性肿瘤生长。在体外和体内实验中, 将丝素蛋白溶液与PVP-1和泛影葡胺(meglumine diatrizoate, MD)混合的水凝胶用于人OS细胞, 并诱导OS生长抑制, 导致与化疗相比全身损伤较少。水凝胶的物理化学性质有助于控制药物递送, 它们无任何机械阻力特性, 在OS的治疗中具有一定潜力。

3 总结与展望

OS是一种起源于间叶组织的原发性恶性肿瘤, 好发于长骨干骺端, 是儿童和青少年最常见的癌症之一, 以出现梭形基质细胞和类骨质为特征, 患者的典型症状是局部肿胀、疼痛和功能受限。局限型OS患者的5年存活率在65%~75%之间, 但几乎80%的OS患者在确诊前已有转移, 化疗耐药或肺转移的患者5年生存率不足20%。现有的化疗药物通过诱导肿瘤细胞凋亡的方式发挥抗肿瘤作用, 但是由于化疗药物耐药性的产生, 骨肉瘤患者的五年生存率依然没有显著改善, 因此需要探索骨肉瘤发生发展的新机制, 探索新的靶向治疗药物, 为骨肉瘤的早期诊断和治疗提供有效的干预策略。

铁死亡是一种不同于细胞焦亡、坏死、自噬和

坏死性凋亡等的新型细胞死亡方式,主要以胱氨酸-谷氨酸逆向转运蛋白系统的活性受到抑制、GSH合成减少及GPX4的失活为主要特征。GPX4作为铁死亡过程中抗氧化系统的核心要素,多数的药物通过抑制GPX4诱导肿瘤细胞铁死亡,而GPX4在铁死亡过程中的表达和活性依赖于GSH的存在。因此,消耗细胞内的GSH会间接抑制GPX4的活性,GPX4表达降低是铁死亡发生的重要标志。在形态上,铁死亡细胞线粒体表现为膜密度浓缩,外膜破裂,体积变小,线粒体嵴减少或消失。除此之外,发生过程包括大量铁积累和脂质过氧化,其中脂质过氧化处于铁死亡发生的核心地位。

诱导癌细胞发生铁死亡是目前极具前景的癌症治疗策略,在抑制肿瘤生长和增殖方面起着至关重要的作用,通过诱导肿瘤细胞铁死亡的方式发挥抗肿瘤作用已经在乳腺癌、胃癌及肝癌等多种癌症中取得了进展。目前铁死亡相关研究正处于迅速发展阶段,诱导铁死亡药物有望成为一种极具前景的癌症诊断和治疗干预方案,对抗肿瘤药物的发展也具有重要意义。铁死亡诱导药物及其他小分子铁死亡药物在未来有潜力成为抗癌用药主力军。除此之外,纳米颗粒及水凝胶载运的药物分子也是未来具有希望性治疗策略的方法之一。然而,现阶段开发的部分铁死亡药物存在生物利用度较差和靶向性不足等问题,阻碍了其临床前景。如在目前研究的基础上将小分子药物组装成特异性受体结合癌细胞靶点进行靶向治疗,将会极大程度提高该类药物在癌症治疗中的地位。因此,通过诱导骨肉瘤细胞铁死亡在未来可能会是一种新的治疗手段,治疗药物诱导骨肉瘤细胞铁死亡的作用靶点及药物副作用仍是未来研究的方向。

参考文献

- [1] Biazzo A, De Paolis M. Multidisciplinary approach to osteosarcoma. *Acta Orthop Belg*, 2016, 82(4): 690-698
- [2] Pang KL, Chin KY. Emerging anticancer potentials of selenium on osteosarcoma. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5318
- [3] Nomura M, Rainusso N, Lee YC, et al. Tegavivint and the β -Catenin/ALDH axis in chemotherapy-resistant and metastatic osteosarcoma. *J Natl Cancer Inst*, 2019, 111(11): 1216-1227
- [4] Xiao X, Wang W, Li Y, et al. HSP90AA1-mediated autophagy promotes drug resistance in osteosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 201
- [5] Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34
- [6] Dietrich C, Hofmann TG. Ferroptosis meets cell-cell contacts. *Cells*, 2021, 10(9): 2462
- [7] Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176
- [8] Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhuet S, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 135-147
- [9] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296
- [10] Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180-1191
- [11] Oh SJ, Ikeda M, Ide T, et al. Mitochondrial event as an ultimate step in ferroptosis. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 414
- [12] Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjori E, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 2007, 447(7146): 864-868
- [13] Riegman M, Sagie L, Galed C, et al. Ferroptosis occurs through an osmotic mechanism and propagates independently of cell rupture. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1042-1048
- [14] Katikaneni A, Jelcic M, Gerlach GF, et al. Lipid peroxidation regulates long-range wound detection through 5-lipoxygenase in zebrafish. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(9): 1049-1055
- [15] Zhao J, Zhao Y, Ma X, et al. Targeting ferroptosis in osteosarcoma. *J Bone Oncol*, 2021, 30: 100380
- [16] Ma Y, Cong L, Shen W, et al. Ferroptosis defense mechanisms: the future and hope for treating osteosarcoma. *Cell Biochem Funct*, 2024, 42(4): e4080
- [17] Das UN. Saturated Fatty Acids, MUFAs and PUFAs regulate ferroptosis. *Cell Chem Biol*, 2019, 26(3): 309-311
- [18] Wang S, Guo Q, Zhou L, et al. Ferroptosis: a double-edged sword. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 265
- [19] Shin D, Lee J, You JH, et al. Dihydrolipoamide dehydrogenase regulates cystine deprivation-induced ferroptosis in head and neck cancer. *Redox Biol*, 2020, 30:

- 101418
- [20] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 225-234
- [21] Kagan VE, Mao G, Qu F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90
- [22] Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(34): E4966- E4975
- [23] Jia B, Li J, Song Y, et al. ACSL4-mediated ferroptosis and its potential role in central nervous system diseases and injuries. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 10021
- [24] Liu J, Kang R, Tang D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis. *FEBS J*, 2022, 289(22): 7038-7050
- [25] Wang Y, Yu R, Wu L, et al. Hydrogen sulfide guards myoblasts from ferroptosis by inhibiting ALOX12 acetylation. *Cell Signal*, 2021, 78: 109870
- [26] Oh M, Jang SY, Lee JY, et al. The lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor *Darapladib* sensitises cancer cells to ferroptosis by remodelling lipid metabolism. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 5728
- [27] Blagov AV, Summerhill VI, Sukhorukov VN, et al. Potential use of antioxidants for the treatment of chronic inflammatory diseases. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1378335
- [28] Xie Y, Zhu S, Song X, et al. The tumor suppressor p53 limits ferroptosis by blocking DPP4 activity. *Cell Rep*, 2017, 20(7): 1692-1704
- [29] Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11-12): 2195-2209
- [30] Gao M, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298-308
- [31] Zhu G, Murshed A, Li H, et al. O-GlcNAcylation enhances sensitivity to RSL3-induced ferroptosis via the YAP/TFRC pathway in liver cancer. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 83
- [32] Zeng X, An H, Yu F, et al. Benefits of Iron Chelators in the treatment of Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2021, 46(5): 1239-1251
- [33] Outten FW, Theil EC. Iron-based redox switches in biology. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(5): 1029-1046
- [34] Kuang F, Liu J, Tang D, et al. Oxidative damage and antioxidant defense in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 586578
- [35] Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 2007, 447(7146): 864-868
- [36] Sui X, Zhang R, Liu S, et al. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ROS production in colorectal cancer. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1371
- [37] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62
- [38] Huang L, Zhong X, Li A, et al. Syntaxin6 contributes to hepatocellular carcinoma tumorigenesis via enhancing STAT3 phosphorylation. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 197
- [39] Pham TH, Park HM, Kim J, et al. STAT3 and p53: dual target for cancer therapy. *Biomedicines*, 2020, 8(12): 637
- [40] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072
- [41] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 2014, 156(1-2): 317-331
- [42] Shi Y, Gong M, Deng Z, et al. Tirapazamine suppress osteosarcoma cells in part through SLC7A11 mediated ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 567: 118-124
- [43] Yang C, Tian Y, Zhao F, et al. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 6985
- [44] Zhang W, Jiang B, Liu Y, et al. Bufotalin induces ferroptosis in non-small cell lung cancer cells by facilitating the ubiquitination and degradation of GPX4. *Free Radical Biol Med*, 2022, 180: 75-84
- [45] Zhang L, Li C, Zhang Y, et al. Ophiopogonin B induces gastric cancer cell death by blocking the GPX4/xCT-dependent ferroptosis pathway. *Oncol Lett*, 2022, 23(3): 104
- [46] Lv H, Zhen C, Liu J, et al. β -Phenethyl isothiocyanate induces cell death in human osteosarcoma through altering iron metabolism, disturbing the redox balance, and activating the MAPK signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5021983
- [47] Lv H, Zhen C, Liu J, et al. PEITC triggers multiple forms of cell death by GSH-iron-ROS regulation in K7M2 murine osteosarcoma cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(8): 1119-1132
- [48] Xu Z, Chen L, Wang C, et al. MicroRNA-1287-5p promotes ferroptosis of osteosarcoma cells through inhibiting GPX4. *Free Radical Res*, 2021, 55(11-12): 1119-1129
- [49] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620

- [50] Liu J, Lou C, Zhen C, et al. Iron plays a role in sulfasalazine-induced ferroptosis with autophagic flux blockage in K7M2 osteosarcoma cells. *Metalomics*, 2022, 14(5): mfac027
- [51] Chen M, Jiang Y, Sun Y. KDM4A-mediated histone demethylation of SLC7A11 inhibits cell ferroptosis in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 550: 77-83
- [52] Luo Y, Gao X, Zou L, et al. Bavachin induces ferroptosis through the STAT3/P53/SLC7A11 axis in osteosarcoma cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1783485
- [53] He T, Lin X, Yang C, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate plays a ROS-mediated dual role in ferroptosis and apoptosis via the MAPK pathway in human osteosarcoma cell lines and xenografts. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8966368
- [54] Lin H, Chen X, Zhang C, et al. EF24 induces ferroptosis in osteosarcoma cells through HMOX1. *Biomed Pharmacother*, 2021, 136: 111202
- [55] Bhaw-Luximon A, Jhurry D. Artemisinin and its derivatives in cancer therapy: status of progress, mechanism of action, and future perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(3): 451-466
- [56] Li Z, Ding X, Wu H, et al. Artemisinin inhibits angiogenesis by regulating p38 MAPK/CREB/TSP-1 signaling pathway in osteosarcoma. *J Cell Biochem*, 2019, 120(7): 11462-11470
- [57] Hosoya K, Murahari S, Laio A, et al. Biological activity of dihydroartemisinin in canine osteosarcoma cell lines. *Am J Vet Res*, 2008, 69(4): 519-526
- [58] Isani G, Bertocchi M, Andreani G, et al. Cytotoxic effects of *Artemisia annua* L. and pure artemisinin on the D-17 canine osteosarcoma cell line. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1615758
- [59] Zhang C, Liu H, Gong M, et al. Biomimetic gold nanocages for overcoming chemoresistance of osteosarcoma by ferroptosis and immunogenic cell death. *Mater Design*, 2021, 110087: 1264-1275
- [60] He G, Nie JJ, Liu X, et al. Zinc oxide nanoparticles inhibit osteosarcoma metastasis by downregulating β -catenin via HIF-1 α /BNIP3/LC3B-mediated mitophagy pathway. *Bioact Mater*, 2022, 19: 690-702
- [61] Xu Y, Qi J, Sun W, et al. Therapeutic effects of zoledronic acid-loaded hyaluronic acid/polyethylene glycol/nanohydroxyapatite nanoparticles on osteosarcoma. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 897641
- [62] Chen F, Zeng Y, Qi X, et al. Targeted salinomycin delivery with EGFR and CD133 aptamers based dual-ligand lipid-polymer nanoparticles to both osteosarcoma cells and cancer stem cells. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2018, 14(7): 2115-2127
- [63] Zhang Y, Song Q, Zhang Y, et al. Iron-based nanovehicle delivering Fin56 for hyperthermia-boosted ferroptosis therapy against osteosarcoma. *Int J Nanomedicine*, 2024, Volume 19: 91-107
- [64] Peng Z, Li M, Wang Y, et al. Self-assembling imageable silk hydrogels for the focal treatment of osteosarcoma. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 698282
- [65] Sun Y, Li K, Li C, et al. Thermogel delivers oxaliplatin and alendronate in situ for synergistic osteosarcoma therapy. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 573962