

铁死亡及其细胞游离亚铁原卟啉 在肿瘤发生中的 作用

朱士法, 孔令斌*

济宁医学院, 山东 济宁

收稿日期: 2022年10月11日; 录用日期: 2022年11月4日; 发布日期: 2022年11月15日

摘 要

铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖性的调节性细胞死亡形式, 由过度的脂质过氧化所引起, 它与各种类型肿瘤的发生和治疗反应密切相关。然而, 铁死亡性损伤(ferroptotic)可在恶性肿瘤微环境中触发炎症相关的免疫抑制, 因而有利于肿瘤的生长。尽管一些研究已经发现癌症相关基因(例如RAS和TP53)的突变、与应激反应通路(stress response pathways) (如NFE2L2信号、自噬和缺氧)有关的蛋白的基因突变与上皮间质转化以及可激活铁死亡的治疗反应之间存在重要的相关性。目前铁死亡对肿瘤生物学的影响程度尚不清楚, 尤其是消化道肿瘤中的铁死亡的调节机制、信号通路及其可检测的生物标志物; 因此, 寻找有助于检测和追踪铁死亡的生物标志物目前成为研究的热点。有研究认为, 细胞游离亚铁原卟啉(cell free ferrous protoporphyrin, FH)是含亚铁原卟啉蛋白的分解产物, 具有强氧化作用, 导致细胞自身调节功能紊乱, 与细胞癌变程度直接密切相关, 目前已应用于宫颈癌、结直肠癌、尿路上皮癌等方面的检测, 成为恶性肿瘤发生过程中产生的因果性生物标志因子。现就铁死亡机制及信号通路及其组织标志物细胞游离亚铁原卟啉FH在肿瘤发生中的作用作一综述, 为肿瘤的诊治提供新的思路和方法。

关键词

铁死亡, 细胞游离亚铁原卟啉, 癌症筛查

The Role of Ferroptosis and Its Cell Free Ferrous Protoporphyrin in Tumorigenesis

Shifa Zhu, Lingbin Kong*

*通讯作者。

Abstract

Ferroptosis is a form of iron-dependent regulatory cell death caused by excessive lipid peroxidation, which is closely related to the occurrence and treatment of various types of tumors. However, ferroptotic injury can trigger inflammation-related immunosuppression in the microenvironment of malignant tumors, which is conducive to tumor growth. Although some studies have found that there is an important correlation between mutations in cancer-related genes (such as RAS and TP53), gene mutations in proteins related to stress response pathways (such as NFE2L2 signaling, autophagy, and hypoxia) and epithelial-mesenchymal transition and therapeutic responses that activate ferroptosis. At present, the effect of ferroptosis on tumor biology is not clear, especially the regulation mechanism, signaling pathway and detectable biomarkers of ferroptosis in digestive tract tumors; therefore, the search for biomarkers to help detect and track ferroptosis is currently a hot research topic. Studies have shown that cell free ferrous protoporphyrin (FH) is a decomposition product of ferrous protoporphyrin protein, which has a strong oxidation effect, leading to the disorder of cell self-regulation function, which is directly related to the degree of cell carcinogenesis. It has been applied to the detection of cervical cancer, colorectal cancer, urothelial carcinoma and other aspects, and has become a causal biomarker factor in the process of malignant tumor. This article reviews the mechanism and signaling pathway of ferroptosis and the role of its tissue marker cell free ferrous protoporphyrin FH in tumorigenesis, and provides new ideas and methods for the diagnosis and treatment of tumors.

Keywords

Ferroptosis, Cell Free Ferrous Protoporphyrin, Early Detection of Cancer

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

铁死亡一词诞生于 2012 年, 是一种铁依赖的非凋亡模式的调节性细胞死亡(regulated cell death, RCD)因不受控制的脂质过氧化和随之带来的质膜破裂所导致。铁死亡可通过外源性或内源性途径诱发, 抑制恶性肿瘤生长。外源性途径激活是指抑制胱氨酸/谷氨酸转运蛋白(又称 system xc⁻)或激活铁转运蛋白、转铁蛋白和乳转铁蛋白(lactotransferrin)等。内源性途径诱发则是阻断细胞内抗氧化酶(如谷胱甘肽过氧化物酶 GPX4)。但到目前铁死亡的效应分子仍尚不清楚。[1] FH 是一种效应性生物标志物, 对细胞具有氧化损伤作用, 通过扰乱细胞周期、损伤线粒体 mtRNA 等破坏细胞稳定性。[2]当直肠黏膜上皮细胞稳定性失调时, 蛋白构型发生改变, 则 FH 在细胞蛋白中脱落, 使直肠粘膜细胞内游离 FH 增多, 则相应的直肠内分泌物 FH 增多。[3] [4]其在细胞自稳调节失衡的早期便可以检测, 与肿瘤的代谢及肿瘤微环境密切相关, 并受多种因素如 Warburg 效应、ROS 氧化机制等的调节。提示 FH 可能与铁死亡有关, 在结直肠癌中, 结直肠粘膜内 FH 水平有可能反应铁死亡的变化, 可以作为结直肠癌的早期诊断及其治疗效果的评估标志物。现就其有关研究综述如下。

2. 铁死亡与肿瘤

2.1. 铁死亡

铁死亡是2012年由Brent Stockwell教授发现的,其由有毒脂质过氧化物和铁过载的过度积累驱动[5]。在形态方面,铁死亡并没有典型的细胞凋亡特征(例如染色质的凝聚以及凋亡小体的形成),却表现出线粒体皱缩、嵴减少的特征。[6]它在形态特征和机制上都不同于凋亡(apoptosis)等其他受调控的细胞死亡方式。根据Stockwell教授的总结,铁死亡包含三个基本 hallmarks: 1) GPX4 的失活; 2) 过量的活性铁; 3) 细胞膜脂的多不饱和脂肪酸(PUFA)被氧化。其形态学特征是线粒体膜密度浓缩,线粒体嵴减少或消失,线粒体外膜破裂。

脂质过氧化物的致死量积累是铁死亡发生的一个主要特征,铁死亡的促进因素超过其防御系统的抗氧化能力,就会发生这样的机制特征明显的不同于其他由细胞死亡执行蛋白(例如 caspase 介导的细胞凋亡,MLKL 介导的程序性坏死(necrosis), gasdermin D 介导的细胞凋亡(pyroptosis))为中心的程序性细胞死亡方式。最后,因铁死亡的细胞还会呈现出独特的氧化磷脂(PL)谱。铁死亡作为一种独特的细胞死亡机制,引起了癌症学界的极巨大关注,可能有助于选择性地消除肿瘤细胞。近年来,探究铁死亡在肿瘤生物学以及癌症治疗中的作用这一方面,研究人员已经取得了较大的进展。[1] [7]一方面,多种癌症相关的信号通路已被证明可以调控癌细胞的铁死亡。已经发现铁死亡参与了几种肿瘤抑制因子(例如 p53 和 BAP1)的调控,这证实铁死亡是阻止癌症发展的天然屏障。[6]而致癌基因以及致癌信号所介导的铁死亡逃避对肿瘤的发生、进展、转移、抵抗是有利的。另一方面,由于癌细胞独特的新陈代谢以及高负荷的活性氧(ROS)特性,以及其本身的特定突变,使一些类型的癌细胞更容易发生铁死亡,例如结直肠肿瘤,从而使铁死亡在这些类型中可以作为具有靶向治疗潜力的弱点。[8]

2.2. 铁死亡与 P53

在肿瘤中 TP53 是最常见的突变基因; [9] [10]它作为转录因子,激活或者抑制多种下游靶基因的转录来行使功能,是诱导细胞发生铁死亡的关键基因。[11] [12] [13] p53 可以参与铁,脂质和活性氧(ROS)这三者的代谢调控,而它们是铁死亡的核心代谢物。许多研究已证实 p53 可以通过抑制 SLC7A11 的表达来增强铁死亡。SLC7A11 是 System x-(抗氧化体系)的亚基,负责主要的转运活性, System xc-的活性抑制会降低胱氨酸的吸收, GSH 的合成减少,细胞抗氧化能力降低,无法抵御活性氧损伤,使细胞铁死亡。[6] [14]而随着顾伟教授的进一步研究发现, p53-SLC7A11 轴还可以通过 GSH 非依赖的方式来促进铁死亡。指出脂质氧化酶 ALOX12 是 p53 依赖的铁死亡发生的关键调控因子, p53 抑制 SLC7A11 的表达后,细胞同时会释放 ALOX12,游离的 ALOX12 则将氧化细胞膜磷脂的多不饱和脂肪酸链,使细胞发生铁死亡。此外,也有人研究发现, ALOXE3 也可以像 ALOX12 一样被 SLC7A11 抑制。[15] p53 能够调节磷酸甘油酯脱氢酶(PHGDH)以抑制 Ser 的合成,也许可以影响 GSH 合成来促进铁死亡。此外, p53 还能通过诱导 lncRNA PVT1 表达[16] [17]或者直接结合线粒体铁转运蛋白 SLC25A28 来促进铁死亡; [18]上述大量的证据支持了 p53 对于铁死亡的促进作用。

然而 p53 也已经被证明在某些情况下中止铁死亡的发生。唐道林等人研究发现,在结直肠癌里 p53 能够直接结合 DPP4 从而将之束缚在细胞核内,以致 DPP4 将不能到细胞质中结合 NOX1 (NOX 可以介导的肠癌细胞中的脂质过氧化反应)来促进铁死亡的发生。[19]另外,细胞周期调节蛋白 p21 是 p53 的重要靶基因。p21 可促进还原性物质 NADPH 和 GSH 的产生抑制铁死亡的发生。[20]最近,顾伟研究发现, p53 的一个新靶基因 iPLA2 β 能够通过切断被氧化的细胞膜 PUFA 来抑制铁死亡。有趣的是:当外界刺激较小的时候, p53 激活 iPLA2 β 的表达,从而抑制铁死亡;但是当外界刺激超过一定阈值, p53 不再能够

激活 iPLA2 β , 从而转为促进铁死亡的发生。[21]这一 two-phase 的作用模型在 p53 调节 ROS, 细胞凋亡等功能里均有体现, 即 P53 为适应不同外界刺激在 ROS、细胞凋亡等过程中表现同样的双阶段性。[22]这反映了 p53 作为细胞守护者(guardian of the cell), 在内外刺激程度较轻, 细胞能够承受的时候, 倾向于降低刺激的后果, 保护细胞不受伤害; 而一旦刺激剧烈, 细胞难以承受, 有破坏基因组或者导致肿瘤的风险时, p53 则会清除掉这些细胞, 从而保护整个机体。

综上所述, 虽然存在少数不相同的实验结论, 当然这可能是因为在实验中细胞类型的不同有关; 但 p53 在绝大多数情况下能够促进细胞发生铁死亡, 从而抑制肿瘤。p53 介导的铁死亡本身也受到多种更上游的机制的调节。

2.3. 铁死亡与 HIF

缺氧会促进肿瘤的形成和治疗耐药性。缺氧的主要调控因子 HIF 由一个 oxygen-labile 的 α 亚基(包括 HIF1 α 、EPAS1 (又称 HIF2 α)和 HIF3 α)和一个构成性(constitutively)表达的 β 亚基(ARNT)组成。[23]在缺氧条件下, 羟化酶失活会导致 HIF1 α 和 EPAS1 积累并与 ARNT 形成异二聚体, 从而诱导低氧适应和生存相关基因的转录。HIF1 α 和 EPAS1 在多种癌症类型中的表达均升高, 通常与患者预后不良有关。[24] [25]。然而, HIF-1 α 在 CRC 中的作用是有争议的, 在结肠癌的小鼠模型中, HIF-1 α 的慢性活化并没有增加散发性或炎症诱导的结肠癌。[26]相比之下, HIF-2 α 对于细胞培养和体内 CRC 的生长和进展至关重要。[27]肠道上皮 HIF-2 α 的激活通过调节炎性细胞因子和趋化因子的表达来诱导有效的上皮促炎反应。[28] [29]且 Rashi Singhal 等人通过动物实验证实 HIF-2 α 的激活上调了结直肠癌(CRC)细胞和小鼠结肠肿瘤中的脂质和铁调节基因, 并导致铁死亡的发生。

通过小分子如 2-methoxyoestradiol (NCT00030095)、BAY 87-2243 (NCT01297530)、PX-478 (NCT00522652)和 PT2385, 抑制 HIF 信号已被在临床试验中证实是一种可以抑制肿瘤生长的策略。[30] [31] [32]其中, 虽然长期使用 PT2385 则会导致耐药性的产生, 但在肾透明细胞癌(RCC)患者中 PT2385 有积极作用。[33] [34]

3. FH 与肿瘤

研究发现, 血红素参与了许多关键的生物功能以及作为基因表达和细胞增殖/分化的调节剂; 但与血红素的积极功能相反, 细胞内游离血红素过量会导致细胞损伤和组织损伤, 其原因是血红素能够催化活性氧(ROS)的形成, 导致氧化应激。不与蛋白质结合的血红素被认为是不稳定的血红素池, 这部分血红素来自新合成的血红素, 尚未掺入血红蛋白, 或在氧化条件下从血红蛋白中释放的血红素。FH 在细胞含亚铁原卟啉蛋白的肽链靠近表面的一个疏水核内, 与附近的残基分子-分子之间的相互作用, 以及与肽链之间的静电引力, 维持空间位置的稳定。当 HIF-1 α 、ROS、VEGF 表达上调时, 使一种亲脂性物质(Hydrophilic fatty molecules)进入细胞含亚铁原卟啉蛋白疏水核内中和肽链上 His、Lys 所带电荷, 使它们不再与 FH 丙酮基侧链保持静电吸引, 促使 FH 在细胞蛋白中脱离。FH 通过与特定蛋白质结合以形成氧传感器或过氧化物酶来执行某些生理功能。研究表明, 激活肿瘤细胞中的氧和缺氧传感器可增强 ROS 活性, 改变细胞内极性定量, 并将疏水性核蛋白中的 FH 释放为游离 FH。

FH 可以参与 Fenton 反应以产生有毒的 HO \cdot 。线粒体酶蛋白基本上都易受游离羟基自由基(HO \cdot)影响, 各种脂溶性抗氧化剂根本不能保护酶活性。[35] HO \cdot 具有极高的氧化还原态势[36]由于在空间结构位置上的态势的原因, 位于线粒体内膜基粒基片的含亚铁原卟啉蛋白最易遭到 HO \cdot 的攻击, 内部结构受到不可逆转的破坏, 使得 FH 进一步析出。[37]而过量的 FH 由于其促进氧化应激和脂质氧化的能力而具有剧毒, 导致膜损伤并最终导致细胞死亡或凋亡。因此, 认为 FH 的浓度与肿瘤的恶变程度密切相关。[38]

FH 是恶性肿瘤发生过程中产生的因果性生物标志因子。恶性肿瘤发生发展过程中, 膜损伤加重, 细胞自溶严重, FH 浸润增加。[39]

4. 铁死亡、P53 与 FH 在肿瘤发生中的相互作用

P53 基因的激活与转录, 是细胞在对抗环境刺激维持自身稳态的结果。在细胞自稳调节失衡早期, 自身的免疫机制及抑癌基因等使异常细胞发生铁死亡来阻止癌症发展, 而其超微形态学特征显示细胞膜断裂和出泡, 线粒体变小、膜密度增高、线粒体脊减少或消失、线粒体外膜断裂。电镜下表现为细胞内线粒体变小及双层膜密度增高。生物学特征铁和活性氧(ROS)聚集, 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)系统的激活, 因而抑制抗氧化体系的亚基, 降低胱氨酸的摄取、影响谷胱甘肽水平等。与 FH 的析出机制基粒的破坏、线粒体的变小、脊减少、ROS 的激活等高度吻合。在细胞自稳调节失衡早期, P53 介导的细胞代谢改变及铁死亡发生为共识, 这也与 FH 在细胞自稳调节失衡早期便可检测到相互吻合。Kanta Kawai 等人基于活性的荧光探针成像研究显示, 游离血红素参与铁死亡。[40] FH 是血红素代谢异常的产物, 而血红素通过 Cys275 和 Cys277 直接与 P53 相互作用。Shen 等人的研究表明, 血红素与 P53 结合, 来介导 P53 基因的不稳定。缺铁以 P53 依赖性方式抑制人结肠癌的发生。[41]相信随着对结直肠癌早期筛查的重视, 将继续推进对结直肠早期肿瘤标记物的研究。

5. 结语与展望

p53 是一个拥有广泛而强大功能的抑癌基因, p53 既可以通过调节肿瘤代谢活动而抑制肿瘤, 也可以通过促进细胞发生铁死亡而抑制肿瘤进展。p53 所调控的铁死亡是与传统以 GPX4 为中心的铁死亡模型既有区别又有联系的一种铁死亡基本通路。特别需要指出的是: 上述 p53/SLC7A11/ALOX12 和 p53/iPLA2 β 两条通路均不依赖于 GPX4 和 ACSL4。这表明这两条通路是有别于 Stockwell 提出的铁死亡经典模型, 代表着一类全新的铁死亡机制。FH 是恶性肿瘤发生过程中产生的因果性生物标志因子。FH 是含亚铁原卟啉蛋白的分解产物, 是一种肿瘤前期产生的临床疾病标志物。在细胞自稳调节失调早期 FH 已经出现, 它的含量与细胞癌变程度成正相关。FH 是血红素代谢异常的产物, 而血红素通过 Cys275 和 Cys277 直接与 P53 相互作用。Shen 等人的研究表明, 血红素与 P53 结合, 来介导 P53 基因的不稳定。Kanta Kawai 等人基于活性的荧光探针成像研究显示, 游离血红素参与铁死亡。[40]随着近年来这一领域的研究进展, 发现在 p53 基因对于肿瘤代谢调解的作用下, FH 的产生与铁死亡可能相关。这可能为 FH 检测对早期癌症筛查的价值提供新证据。因此, 推测粘膜组织细胞恶变及其程度可通过测定局部组织渗液细胞中 FH 物质含量显示, 考虑到 FH 检测属于无创采样、费用低, 操作简便, 检测具有连续可测性, 下一步我们要开始开展应用 FH 检测技术进一步筛查肿瘤早期自稳调节失衡的临床研究, 进一步探究两者的相关性, 为早期筛查和基因靶向治疗提供新的方法。

参考文献

- [1] Skoupilová, H., Michalová, E. and Hrstka, R. (2018) Ferroptosis as a New Type of Cell Death and Its Role in Cancer Treatment. *Klinická onkologie: Casopis České a Slovenské onkologické společnosti*, **31**, 21-26. <https://doi.org/10.14735/amko20182S21>
- [2] Orino, K. (2013) Functional Binding Analysis of Human Fibrinogen as an Iron- and Heme-Binding Protein. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, **26**, 789-794. <https://doi.org/10.1007/s10534-013-9657-8>
- [3] 朱智宇, 许国诚, 林晔, 魏良宝, 雷辉, 袁阁林. 直肠上皮细胞稳定性 FH 检测对直肠癌筛查诊治的临床研究[J]. 中外医疗, 2019, 38(6): 189-191.
- [4] 王昕昕, 索冰, 李超, 等. 直肠黏膜渗液 FH 检测在非手术直肠癌局部疗效评价中的临床意义[J]. 中华普外科手术

术学杂志(电子版), 2019, 13(3): 270-272.

- [5] Lei, G., Zhuang, L. and Gan, B. (2022) Targeting Ferroptosis as a Vulnerability in Cancer. *Nature Reviews. Cancer*, **22**, 381-396. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00459-0>
- [6] Xie, Y., Hou, W., Song, X., *et al.* (2016) Ferroptosis: Process and Function. *Cell Death and Differentiation*, **23**, 369-379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>
- [7] Valashedi, M.R., Nikoo, A., Najafi-Ghalehlou, N., *et al.* (2022) Pharmacological Targeting of Ferroptosis in Cancer Treatment. *Current Cancer Drug Targets*, **22**, 108-125. <https://doi.org/10.2174/1568009621666211202091523>
- [8] Mbah, N.E. and Lyssiotis, C.A. (2022) Metabolic Regulation of Ferroptosis in the Tumor Microenvironment. *The Journal of Biological Chemistry*, **298**, Article ID: 101617. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101617>
- [9] Mendiratta, G., Ke, E., Aziz, M., Liarakos, D., Tong, M. and Stites, E.C. (2021) Cancer Gene Mutation Frequencies for the U.S. Population. *Nature Communications*, **12**, Article No. 5961.
- [10] Dolgin, E. (2017) The Most Popular Genes in the Human Genome. *Nature*, **551**, 427-431. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-07291-9>
- [11] Hernández Borrero, L.J. and El-Deiry, W.S. (2021) Tumor Suppressor p53: Biology, Signaling Pathways, and Therapeutic Targeting. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, **1876**, Article ID: 188556. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>
- [12] Harris, S.L. and Levine, A.J. (2005) The p53 Pathway: Positive and Negative Feedback Loops. *Oncogene*, **24**, 2899-2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>
- [13] Chen, J. (2016) The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**, a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>
- [14] Xue, W., Zender, L., Miething, C., *et al.* (2007) Senescence and Tumour Clearance Is Triggered by p53 Restoration in Murine Liver Carcinomas. *Nature*, **445**, 656-660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>
- [15] Chu, B., Kon, N., Chen, D., *et al.* (2019) ALOX12 Is Required for p53-Mediated Tumour Suppression through a Distinct Ferroptosis Pathway. *Nature Cell Biology*, **21**, 579-591. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0305-6>
- [16] Lu, J., Xu, F. and Lu, H. (2020) LncRNA PVT1 Regulates Ferroptosis through miR-214-Mediated TFR1 and p53. *Life Sciences*, **260**, Article ID: 118305. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118305>
- [17] Xiong, X., Yuan, J., Zhang, N., Zheng, Y., Liu, J. and Yang, M. (2020) Silencing of lncRNA PVT1 by miR-214 Inhibits the Oncogenic GDF15 Signaling and Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **521**, 478-484. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.137>
- [18] Zhang, Z., Guo, M., Shen, M., *et al.* (2020) The BRD7-P53-SLC25A28 Axis Regulates Ferroptosis in Hepatic Stellate Cells. *Redox Biology*, **36**, Article ID: 101619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101619>
- [19] Xie, Y., Zhu, S., Song, X., *et al.* (2017) The Tumor Suppressor p53 Limits Ferroptosis by Blocking DPP4 Activity. *Cell Reports*, **20**, 1692-1704. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.055>
- [20] Lossaint, G., Horvat, A., Gire, V., *et al.* (2022) Reciprocal Regulation of p21 and Chk1 Controls the Cyclin D1-RB Pathway to Mediate Senescence Onset after G2 Arrest. *Journal of Cell Science*, **135**, jcs259114. <https://doi.org/10.1242/jcs.259114>
- [21] Chen, D., Chu, B., Yang, X., *et al.* (2021) iPLA2 β -Mediated Lipid Detoxification Controls p53-Driven Ferroptosis Independent of GPX4. *Nature Communications*, **12**, Article No. 3644. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23902-6>
- [22] Lane, D. and Levine, A. (2010) p53 Research: The Past Thirty Years and the Next Thirty Years. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**, a000893. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000893>
- [23] Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Basic-helix-loop-helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O₂ Tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 5510-5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
- [24] Panieri, E. and Santoro, M.M. (2016) ROS Homeostasis and Metabolism: A Dangerous Liason in Cancer Cells. *Cell Death & Disease*, **7**, e2253. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.105>
- [25] Srinivas, U.S., Tan, B., Vellayappan, B.A. and Jeyasekharan, A.D. (2019) ROS and the DNA Damage Response in Cancer. *Redox Biology*, **25**, Article ID: 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- [26] Xue, X., Ramakrishnan, S.K. and Shah, Y.M. (2014) Activation of HIF-1 α Does Not Increase Intestinal Tumorigenesis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **307**, G187-G195. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00112.2014>
- [27] Shay, J.E., Intiyaz, H.Z., Sivanand, S., *et al.* (2014) Inhibition of Hypoxia-Inducible Factors Limits Tumor Progression in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Carcinogenesis*, **35**, 1067-1077. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu004>
- [28] Xue, X., Ramakrishnan, S.K., Weisz, K., *et al.* (2016) Iron Uptake via DMT1 Integrates Cell Cycle with JAK-STAT3

- Signaling to Promote Colorectal Tumorigenesis. *Cell Metabolism*, **24**, 447-461. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.015>
- [29] Triner, D. and Shah, Y.M. (2016) Hypoxia-Inducible Factors: A Central Link between Inflammation and Cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, **126**, 3689-3698. <https://doi.org/10.1172/JCI84430>
- [30] Suzuki, R.N., Newman, S.P., Purohit, A., Leese, M.P., Potter, B.V. and Reed, M.J. (2003) Growth Inhibition of Multi-Drug-Resistant Breast Cancer Cells by 2-Methoxyoestradiol-bis-sulphamate and 2-Ethyl-oestradiol-bis-sulphamate. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **84**, 269-278. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00035-9)
- [31] Lee, K. and Kim, H.M. (2011) A Novel Approach to Cancer Therapy Using PX-478 as a HIF-1 α Inhibitor. *Archives of Pharmacal Research*, **34**, 1583-1585. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1021-3>
- [32] Palayoor, S.T., Mitchell, J.B., Cerna, D., Degraff, W., John-Aryankalayil, M. and Coleman, C.N. (2008) PX-478, an Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Enhances Radiosensitivity of Prostate Carcinoma Cells. *International Journal of Cancer*, **123**, 2430-2437. <https://doi.org/10.1002/ijc.23807>
- [33] Chen, W., Hill, H., Christie, A., *et al.* (2016) Targeting Renal Cell Carcinoma with a HIF-2 Antagonist. *Nature*, **539**, 112-117. <https://doi.org/10.1038/nature19796>
- [34] Cho, H., Du, X., Rizzi, J.P., *et al.* (2016) On-Target Efficacy of a HIF-2 α Antagonist in Preclinical Kidney Cancer Models. *Nature*, **539**, 107-111. <https://doi.org/10.1038/nature19795>
- [35] Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L. and Davies, K.J. (1990) The Oxidative Inactivation of Mitochondrial Electron Transport Chain Components and ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 16330-16336. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46227-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46227-2)
- [36] Cadenas, E. and Davies, K.J. (2000) Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. *Free Radical Biology & Medicine*, **29**, 222-230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
- [37] Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J. and Janda, K. (2020) Reactive Oxygen Species—Sources, Functions, Oxidative Damage. *PolskimerkursuslekarSKI: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, **48**, 124-127.
- [38] Chiabrando, D., Vinchi, F., Fiorito, V., Mercurio, S. and Tolosano, E. (2014) Heme in Pathophysiology: A Matter of Scavenging, Metabolism and Trafficking across Cell Membranes. *Frontiers in Pharmacology*, **5**, Article No. 61. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00061>
- [39] Li, S., Chen, Z., Chen, R., *et al.* (2022) Preoperative Free Ferrous Protoporphyrin and Reactive Oxygen Species Status of Voided Urine Predicts Potential Recurrence Risk in NMIBC. *Cancer Management and Research*, **14**, 2291-2297. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S371974>
- [40] Kawai, K., Hirayama, T., Imai, H., *et al.* (2022) Molecular Imaging of Labile Heme in Living Cells Using a Small Molecule Fluorescent Probe. *Journal of the American Chemical Society*, **144**, 3793-3803. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c08485>
- [41] Wang, T., Ashrafi, A., Modareszadeh, P., *et al.* (2021) An Analysis of the Multifaceted Roles of Heme in the Pathogenesis of Cancer and Related Diseases. *Cancers*, **13**, Article No. 4142. <https://doi.org/10.3390/cancers13164142>