

# Tubacin增敏在胱氨酸剥夺条件下三阴性乳腺癌铁死亡

吴灿章\*, 敬波, 郑武平, 吴煌福#

海南医学院第二附属医院甲乳外科, 海南 海口

收稿日期: 2023年4月28日; 录用日期: 2023年5月21日; 发布日期: 2023年5月31日

## 摘要

目的: Tubacin可以转变恶性肿瘤的胱氨酸不敏感的状态, 我们研究主要目的是验证Tubacin在胱氨酸剥夺条件下处理三阴性乳腺癌细胞HCC38的实际效果, 并验证细胞死亡类型是否为铁死亡。方法: 将细胞株HCC38在DMSO、Tubacin、Erastin、及Tubacin联合Erastin四组条件下培养, 通过7-AAD、LDH、ROS及脂质过氧化物检测细胞死亡及类型。结果: 1) 在胱氨酸剥夺处理条件下加入Tubacin, HCC38细胞死亡增加; 2) Tubacin联合Erastin处理HCC38, 细胞死亡显著增加; 3) Tubacin联合Erastin处理的HCC38, 细胞脂质过氧化物显著和盘状结构域受体2增多。结论: Tubacin增敏在胱氨酸剥夺条件下三阴性乳腺癌铁死亡。

## 关键词

三阴性乳腺癌, 细胞死亡, Tubacin, Erastin, Ferroptosis

# Tubacin plus Erastin Treatment Sensitizes Cell Ferroptosis of Triple Negative Breast Neoplasms

Canzhang Wu\*, Bo Jing, Wuping Zheng, Huangfu Wu#

Department of Breast and Thyroid Surgery, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

Received: Apr. 28<sup>th</sup>, 2023; accepted: May 21<sup>st</sup>, 2023; published: May 31<sup>st</sup>, 2023

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 吴灿章, 敬波, 郑武平, 吴煌福. Tubacin 增敏在胱氨酸剥夺条件下三阴性乳腺癌铁死亡[J]. 临床医学进展, 2023, 13(5): 8741-8748. DOI: 10.12677/acm.2023.1351222

## Abstract

**Purpose:** Tubain can change the cystine insensitive state of malignant tumors. Our main purpose is to verify the actual effect of Tubain on HCC38 cells of triple negative breast cancer under the condition of cystine deprivation, and to verify whether the type of cell death is iron death. **Methods:** Cell line HCC38 was cultured under four conditions: DMSO, tubacin, erastin, and tubacin plus erastin, and cell death and types were determined by 7-AAD, LDH, ROS, and lipid peroxides. **Results:** 1) Addition of tubacin under cystine deprivation treatment conditions increased HCC38 cell death; 2) Treatment of HCC38 with tubacin in combination with erastin significantly increased cell death; 3) HCC38, treated with tubacin in combination with erastin, showed a significant increase in cellular lipid peroxides and discoidin domain receptor 2. **Conclusions:** Tubacin sensitizes iron death in triple negative breast cancer under cystine deprived conditions.

## Keywords

Triple Negative Breast Neoplasms, Cell Death, Tubacin, Erastin, Ferroptosis

Copyright © 2023 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. 引言

女性恶性肿瘤是危害女性健康的重要因素，其中最为常见的是乳腺癌，化学药物治疗和手术治疗是主要诊疗方案。由于细胞分子特征存在，传统治疗方式联合靶向、免疫、内分泌治疗，对于改善乳腺癌患者生活质量，延长患者生存情况，均取得不错的疗效。但是，三阴性乳腺癌缺乏明确的雌、孕及 Her-2 靶标，导致相应的治疗药物缺乏，也更容易对化疗药物产生抗性，使得三阴性乳腺癌的疗效也要明显低于其他亚型的乳腺癌[1]。三阴性乳腺癌靶点研究及药物研发是目前亟待解决的问题。随着恶性肿瘤的分子生物学的发展和细胞内代谢特征理论的完善，学者们通过观察细胞恶变过程，并提出“代谢脆弱性”，比如，众所周知的沃伯格效应，细胞在足够多的 O<sub>2</sub> 供给下，某些恶性肿瘤在发生有氧氧化反应的过程中，肿瘤细胞仍会出现糖酵解这一反应。究其内在原因，是因为癌细胞快速增殖过程中对葡萄糖高度成瘾性，因此，葡萄糖类似物的药物被发现可以有效地抑制对葡萄糖高敏感性的肿瘤细胞[2] [3]。此外，在许多因为基因突变引起的致癌性疾病当中，我们也经常观察到氨基酸代谢的紊乱，比如，原癌基因 KRAS 能下调 GLUD 的表达并上调 GOT 的表达，促进 ME1 将天冬氨酸释放到细胞质中用于生成 NADPH，这有助于恶性肿瘤细胞的快速增殖，满足癌细胞对 ATP、生物合成前体和还原剂的需求，因此，消耗或者抑制天冬氨酸就可实现抑制肿瘤的目的[4]。因此，癌细胞代谢异常和脆弱性为肿瘤的抑制创造条件，也让正面临困境的三阴性乳腺癌治疗研究有了新的转机。

2012 年，Dixon 的研究团队最先提出铁死亡概念[5]，他们认为铁死亡是一种铁离子介导，诱导活性氧生成，以过氧化脂质蓄积为特征的细胞死亡形式。近年来，它在人体多种疾病系统中，如肿瘤、心血管系统疾病等均有发现[6] [7]。研究发现，人体肿瘤细胞的发生发展及增殖也容易受到铁死亡的影响[8]，肿瘤细胞的增殖往往有铁依赖性，如：乳腺癌[9]、结直肠癌[10]、前列腺癌[11]。随着铁离子增多，过氧化物和活性氧积聚，这使得一些高度恶性的肿瘤细胞对于铁死亡有天然的易感性，而诱导癌细胞发生铁

死亡成为治疗恶性肿瘤的新方法。因此，这也为乳腺癌的治疗提供新的思路和策略。有学者研究发现，通过抑制“system Xc<sup>-</sup>”，可引起活性氧堆积，触发癌细胞铁死亡[12] [13] [14]。胱氨酸谷氨酸转运体，通过转运胞外胱氨酸或转硫途径直接提供胱氨酸用于谷胱甘肽的合成，用以调节细胞铁死亡。因此，许多研究者针对该转运体进行铁死亡靶向药物研究与设计，其中，Erastin 是经典的铁死亡诱导剂[15] [16] [17]，通过直接抑制“system Xc<sup>-</sup>”发挥作用，这对不同亚型乳腺癌细胞诱导铁死亡及抑制细胞增殖均有作用。但非间充质三阴性乳腺癌细胞增殖不过分依赖胱氨酸，故 Erastin 对非间充质三阴性乳腺癌细胞铁死亡效果平平[18]。因此，我们尝试为非间充质 TNBC 寻找死亡增敏剂，有研究发现，Tubacin 可以作为一种佐剂，改变癌细胞胱氨酸不敏感的特征[19] [20]。我们尝试将 Tubacin 加入胱氨酸剥夺处理条件下的 HCC38 当中，观察细胞死亡具体情况，并鉴定死亡类型是否为铁死亡，进行初步探索。

## 2. 材料及方法

### 2.1. 细胞来源及主要试剂

三阴性乳腺癌细胞 HCC38 细胞购自 ATCC；Erastin、Tubacin 购自 Cayman Chemicals；7-Aminoactinomycin D (7-AAD)、DMSO 购自 ThermoFisher Scientific；DMEM 培养基购自 Hyclone；EDTA 胰酶消化液购自 Biosharp；PBS 购自 Boster、ROS 探针均购自南京建成生物研究所。

### 2.2. 细胞活力和毒性实验

严格按照说明书，通过 7-AAD 染色 HCC38 细胞，对细胞活力进行测定。将 7-AAD 原液 5  $\mu$ l 加入到在缓冲液中配成 100  $\mu$ l 的 7-AAD 工作液，在培养基的 96 孔板中培养的 HCC38 细胞中，37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 5 分钟，并使用流式细胞仪检测发光强度。严格按照说明书，使用 LDH 实验法，通过细胞膜破裂和释放的蛋白酶来测量细胞毒性试验。将催化液 30  $\mu$ l 与 2.25 染色液 Catalyst 配置成可使用 20 次的 LDH 工作液，随后加入缓冲液配置成 200  $\mu$ l 在 96 孔板中，随后加入 HCC38 细胞，在 37 度下孵育 5 分钟，微孔读板仪在 490~500 nm 检测所有样本的吸光值。

### 2.3. 活性氧的测定

按照 ROS 测定试剂盒的说明，将细胞与 2 $\mu$ l，7 $\mu$ l-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针在黑暗中孵育 30 分钟。然后，在荧光微孔板下观察荧光强度。受激光波长为 485 nm，发射光波长为 525 nm。ROS 水平(%) = 干预组/对照组的荧光值 100%。

### 2.4. Western blot

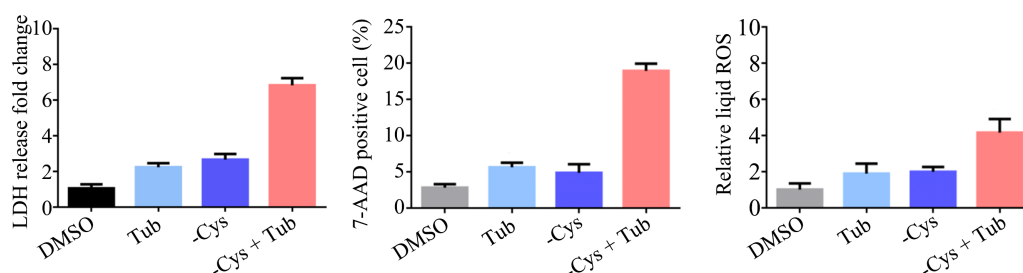
按照制造商的方案，使用 BCA 测定法对蛋白质浓度进行定量。将约 20  $\mu$ g 的蛋白质负载在 8% SDS-PAGE 凝胶上，转移到 PDVF 膜上，用含有 5%脱脂乳的 TBST 进行封闭，与 DDR2/GAPDH 的一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。随后，依次进行 TBST 洗涤，加入相应二抗孵育，再次洗涤。最后，以相同的比例的显影配置液进行配制，随后将膜置入其中，并且曝光于曝光机上，最后将处理好的 PVDF 膜通过凝胶成像分析系统进行检测分析。

## 3. 结果

### 3.1. 在胱氨酸剥夺条件下加入 Tubacin，HCC38 细胞死亡显著增加

此前，我们已经知道，胱氨酸剥夺治疗可以有效抑制乳腺癌细胞增长，诱导铁死亡发生，但是非间充质的三阴性乳腺癌细胞增殖对胱氨酸并不过分依赖，胱氨酸剥夺对 TNBC 细胞抑制作用较差。然而，

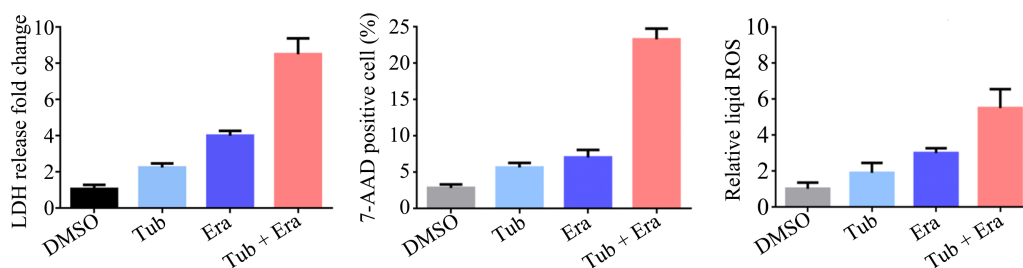
有研究者发现, Tubacin 常常作为佐剂, 改变恶性肿瘤细胞的表现遗传特征, 协助靶向药物或者化疗药物, 增强对癌细胞的抑制作用, 尤其是存在药物抗性的癌细胞[19] [20]。因此, 我们尝试在胱氨酸缺乏的培养基中加入 Tubacin, 观察细胞死亡情况。首先我们设立四组, 分别在 DMSO、Tub、-Cys、-Cys + Tub 条件下处理 HCC38, 检测细胞死亡的情况。我们观察到, 各组的 LDH、7-AAD 均不同程度增加, 而在 -Cys + Tub 组别中, 细胞死亡情况显著。有学者研究发现[21], 对乳腺癌进行胱氨酸剥夺处理引起癌细胞铁死亡, 而这一过程中常常伴有 GSH/GPX4 合成减少, 活性氧/羟基自由基等氧化性物质增多, 因此, 检测活性氧产生情况, 对于鉴别癌细胞铁死亡存在一定意义。我们观察到, 在 -Cys、-Cys + Tub 组别中, 活性氧不同程度增高, 而后者显著增高, 见图 1。



**Figure 1.** Cell death and reactive oxygen species in triple negative breast cancer  
**图 1.** 三阴性乳腺癌细胞死亡及活性氧的情况

### 3.2. Tubacin 联合 Erastin 处理 HCC38, 细胞死亡显著增加

许多正常细胞恶变过程中, 大多数都会出现氨基酸代谢异常, 其中癌细胞增殖过程中的胱氨酸成瘾性的特征较为常见。在上述数据中, 我们证实单独使用胱氨酸剥夺处理三阴性乳腺癌细胞的组别, 细胞并没有出现明显死亡。然而, 加入 Tubacin 后, 细胞死亡则显著增加, 这说明 Tubacin 作为佐剂, 处理胱氨酸不敏感的 HCC38 是有效的。为了观察胱氨酸剥夺的药物性抑制剂是否可以取得同样抑制癌细胞的效果, 我们尝试将 Erastin 取代 -Cys 对 HCC38 进行处理。我们观察到了与乏胱氨酸培养基处理癌细胞的相似结果, 与 DMSO、Tub 相比, Era、Era + Tub 组中, LDH 和 7-AAD 均不同程度增高, 活性氧也检测到相似情况, 见图 2。



**Figure 2.** Cell death and reactive oxygen species in triple negative breast cancer  
**图 2.** 三阴性乳腺癌细胞死亡及活性氧的情况

### 3.3. Tubacin 联合 Erastin 处理的 HCC38, 细胞脂质过氧化物显著和盘状结构域受体 2 增多

尽管活性氧在鉴别细胞铁死亡类型存在一定意义, 但是 ROS 作为验证铁死亡的标志物特异性并不高, 为了进一步确定细胞死亡类型是否为铁死亡, 利用 C11-BODYPY 探针染色四组细胞, 通过流式细胞仪分析细胞当中铁死亡标志物产生情况。我们观察到, 与 DMSO、Era 及 Tub 相比, Tub + Era 组别脂质

过氧化显著增多。此外,我们检测铁死亡重要基因表达情况,我们意外,发现盘状结构域受体 2 (DDR2) 升高,见图 3 和图 4。

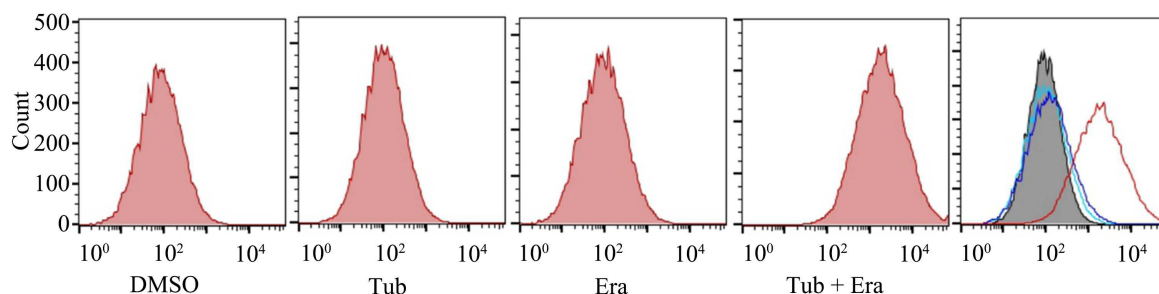


Figure 3. Lipid peroxide production in triple negative breast cancer cells from each group

图 3. 各组三阴性乳腺癌细胞脂质过氧化物产生的情况

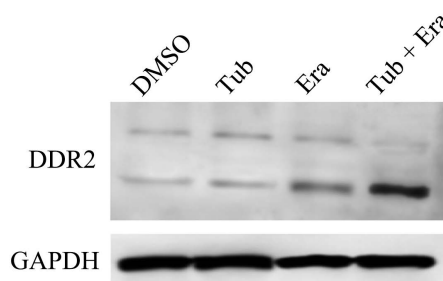


Figure 4. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) production in triple negative breast cancer from various groups

图 4. 各组三阴性乳腺癌盘状结构域受体 2 (DDR2) 产生的情况

## 4. 讨论

在乳腺恶性肿瘤不同类别中, TNBC 是侵袭程度较高, 预后较差的亚型, 化疗是其重要治疗方案, 其在分子代谢上诱导癌细胞发生程序性死亡[22]。但是, 三阴性乳腺癌缺乏敏感靶点, 这就导致可以使用的化疗药物有限, 并且治疗效果较差, 同时, 在化疗过程中, TNBC 患者易出现耐药性和复发, Jae Young So 等人研究表明, 在对部分 TNBC 患者持续随访过程中, 发现三阴性乳腺癌患者预后差, 10 年内约 50% 患者出现复发或转移, 其中约 20 名化疗后患者对化疗药物产生抗性[23]。幸运的是, 乳腺癌铁死亡研究或许能改变这一情况。有研究者发现, 对胱氨酸饥饿治疗可以有效抑制癌细胞增殖, 并且诱导细胞的铁死亡, 而这一情况在乳腺癌当中也获得了相同的效果[24] [25]。比如属于间充质状态的复发性乳腺癌当中高表达 RIPK3 可以增加对细胞外胱氨酸依赖, 因此使用药物消耗小鼠内胱氨酸可以抑制乳腺癌的生长[26] [27]。然而, 三阴性乳腺癌细胞大多数是属于非间充质的乳腺癌, 其增殖和生长并不过分依赖胱氨酸, 对胱氨酸饥饿的治疗没有明显反应[28] [29]。因此, 在我们的实验当中, 无论是在乏胱氨酸培养基(-Cys)或者 Erastin 组中, 我们都没有看到 TNBC 细胞受到明显的抑制。但是, 随着我们加入 Tubacin 这一佐剂后, LDH、7-AAD 阳性细胞比率显著增加, 这让我们确定 Tubacin 可以增敏胱氨酸剥夺条件下增敏三阴性乳腺癌细胞的死亡。尽管我们已经知道 Erastin 是一种经典的铁死亡诱导剂, 而在我们上述数据中证实 Tubacin 可以作为一种 TNBC 死亡增敏剂。但是, 对于 Erastin 联合 Tubacin 引起的细胞死亡类型是否为铁死亡我们仍需要进一步检测。首先, 我们检测了各组中的活性氧(ROS)的情况, Erastin 致癌细胞铁死亡过程中伴随 ROS 的增多, 因此 ROS 检测对铁死亡的判断存在一定价值[30] [31], 我们观察到 -Cys、-Cys + Tub 和 Era、Tub + Era 中 ROS 均不同程度的增高, 联合组别中较为显著。尽管 ROS 的检测对癌细胞铁

死亡鉴别存在帮助,但是 ROS 特异性不高。随后,我们进一步对各组中脂质过氧化物的产生情况进行检测。通过使用 C11-BODYPY 染剂和流式细胞仪,我们观察到, Tub + Era 组中脂质过氧化物显著增多,这一情况符合铁死亡特征。此外,Erastin 诱导癌细胞铁死亡时伴有铁相关蛋白的表达增多[32] [33]。并且,我们尝试检测铁死亡相关基因的表达[34] [35],令人意外的是,我们观察到 Era、Tub + Era 组中盘状结构域受体 2 (DDR2)条带增粗,这说明 Tubacin 联合 Erastin 引起的铁死亡的分子机制可能与 DDR2 存在联系。在我们传统的认知当中,DDR2 往往在肿瘤细胞的增殖密度、转移中起到重要作用[36],然而,近期有学者研究发现,DDR2、细胞密度以及铁死亡之间存在一定关联[37],这为我们继续研究 Tubacin 联合 Erastin 诱导铁死亡的机制打开了新思路。在目前数据中,我们已经证实了 Tubacin 联合 Erastin 增敏了 TNBC 铁死亡,但是在 Aldana-Masangkay 等人研究中提到单独使用 Tubacin 处理急性淋巴细胞白血病细胞则可以诱导凋亡的发生[38]。因此,尽管我们确定 Tubacin 可以改善 TNBC 胱氨酸不敏感的特征并作为佐剂协助铁死亡诱导剂 Erastin 治疗 TNBC,但是对于 Tubacin 联合 Erastin 引起细胞死亡是否只有铁死亡尚不能完全定论,这在后续实验中还需要进一步论证。总而言之,在未来的研究中,我们将继续沿着这一思路,对 Tubacin、Erastin 及包括铁死亡在内的细胞死亡之间联系继续进行探索。

## 基金项目

海南省重点研发计划(ZDYF2021SHFZ248)。

## 参考文献

- [1] Poggio, F., Bruzzone, M., Ceppi, M., *et al.* (2018) Platinum-Based Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Oncology*, **29**, 1497-1508. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy127>
- [2] Akins, N.S., Nielson, T.C. and Le, H.V. (2018) Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **18**, 494-504. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180523111351>
- [3] Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. and Thompson, C.B. (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, **324**, 1029-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- [4] Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., *et al.* (2007) Deficiency in Glutamine but Not Glucose Induces MYC-Dependent Apoptosis in Human Cells. *Journal of Cell Biology*, **178**, 93-105. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703099>
- [5] Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., *et al.* (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, **149**, 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- [6] 徐畅, 黄楠, 孙奋勇. 铁死亡在肿瘤中的研究进展[J]. 同济大学学报, 2021, 42(3): 432-440.
- [7] Schonberg, D.L., Miller, T.E., Wu, Q., *et al.* (2015) Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-Like Cells. *Cancer Cell*, **28**, 441-455. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.002>
- [8] 王慧星, 韩晨阳, 李全波, 刘靖芷, 马文庭, 周国明, 蒋宁, 史可梅. 铁死亡在脂多糖诱导巨噬细胞损伤小鼠模型中的增强作用[J]. 中华疼痛学杂志, 2021, 17(3): 242-249.
- [9] Miller, L.D., Coffman, L.G., Chou, J.W., *et al.* (2011) An Iron Regulatory Gene Signature Predicts Outcome in Breast Cancer. *Cancer Research*, **71**, 6728-6737. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1870>
- [10] Sornjai, W., Nguyen Van Long, F., Pion, N., *et al.* (2020) Iron and Heparin Mediate Human Colorectal Cancer Cell Growth. *Chemico-Biological Interactions*, **319**, Article ID: 109021. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109021>
- [11] Tesfay, L., Clausen, K.A., Kim, J.W., *et al.* (2015) Heparin Regulation in Prostate and Its Disruption in Prostate Cancer. *Cancer Research*, **75**, 2254-2263. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2465>
- [12] Ungard, R.G., Linher-Melville, K., Nashed, M.G., *et al.* (2019) xCT Knockdown in Human Breast Cancer Cells Delays Onset of Cancer-Induced Bone Pain. *Molecular Pain*, **15**. <https://doi.org/10.1177/1744806918822185>
- [13] Chen, M.S., Wang, S.F., Hsu, C.Y., *et al.* (2017) CHAC1 Degradation of Glutathione Enhances Cystine-Starvation-Induced Necroptosis and Ferroptosis in Human Triple Negative Breast Cancer Cells via the GCN2-eIF2 $\alpha$ -ATF4 Pathway. *Oncotarget*, **8**, 114588-114602. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23055>
- [14] Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., *et al.* (2014) Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4.

- Cell*, **156**, 317-331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010>
- [15] Yu, M., Gai, C., Li, Z., *et al.* (2019) Targeted Exosome-Encapsulated Erastin Induced Ferroptosis in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Cancer Science*, **110**, 3173-3182. <https://doi.org/10.1111/cas.14181>
- [16] Wu, X., Liu, C., Li, Z., *et al.* (2020) Regulation of GSK3 $\beta$ /Nrf2 Signaling Pathway Modulated Erastin-Induced Ferroptosis in Breast Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, **473**, 217-228. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03821-8>
- [17] Chen, C., Xie, B., Li, Z., *et al.* (2022) Fascin Enhances the Vulnerability of Breast Cancer to Erastin-Induced Ferroptosis. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 150. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04579-1>
- [18] Tang, X., Ding, C.K., Wu, J., *et al.* (2017) Cystine Addiction of Triple-Negative Breast Cancer Associated with EMT Augmented Death Signaling. *Oncogene*, **36**, 4235-4242. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.394>
- [19] Marcus, A.I., Zhou, J., O'Brate, A., *et al.* (2005) The Synergistic Combination of the Farnesyl Transferase Inhibitor Lonafarnib and Paclitaxel Enhances Tubulin Acetylation and Requires a Functional Tubulin Deacetylase. *Cancer Research*, **65**, 3883-3893. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3757>
- [20] Yu, S., Cai, X., Wu, C., *et al.* (2017) Targeting HSP90-HDAC6 Regulating Network Implicates Precision Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, **13**, 505-517. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18834>
- [21] Miyamoto, K., Watanabe, M., Boku, S., *et al.* (2020) xCT Inhibition Increases Sensitivity to Vorinostat in a ROS-Dependent Manner. *Cancers (Basel)*, **12**, Article No. 827. <https://doi.org/10.3390/cancers12040827>
- [22] Erić, I., Petek Erić, A., Kristek, J., *et al.* (2018) Breast Cancer in Young Women: Pathologic and Immunohistochemical Features. *Acta Clinica Croatica*, **57**, 497-502. <https://doi.org/10.20471/acc.2018.57.03.13>
- [23] So, J.Y., Ohm, J., Lipkowitz, S. and Yang, L. (2022) Triple Negative Breast Cancer (TNBC): Non-Genetic Tumor Heterogeneity and Immune Microenvironment: Emerging Treatment Options. *Pharmacology & Therapeutics*, **237**, Article ID: 108253. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108253>
- [24] Saito, Y. and Soga, T. (2021) Amino Acid Transporters as Emerging Therapeutic Targets in Cancer. *Cancer Science*, **112**, 2958-2965. <https://doi.org/10.1111/cas.15006>
- [25] Lee, N., Carlisle, A.E., Peppers, A., *et al.* (2021) xCT-Driven Expression of GPX4 Determines Sensitivity of Breast Cancer Cells to Ferroptosis Inducers. *Antioxidants (Basel)*, **10**, Article No. 317. <https://doi.org/10.3390/antiox10020317>
- [26] Lin, C.C., Mabe, N.W., Lin, Y.T., *et al.* (2020) RIPK3 Upregulation Confers Robust Proliferation and Collateral Cystine-Dependence on Breast Cancer Recurrence. *Cell Death & Differentiation*, **27**, 2234-2247. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0499-y>
- [27] Mabe, N.W., Garcia, N.M.G., Wolery, S.E., *et al.* (2020) G9a Promotes Breast Cancer Recurrence through Repression of a Pro-Inflammatory Program. *Cell Reports*, **33**, Article ID: 108341. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108341>
- [28] Tu, Z. and Karnoub, A.E. (2022) Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Breast Cancer Development and Management. *Seminars in Cancer Biology*, **86**, 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.09.002>
- [29] Grasset, E.M., Dunworth, M., Sharma, G., *et al.* (2022) Triple-Negative Breast Cancer Metastasis Involves Complex Epithelial-Mesenchymal Transition Dynamics and Requires Vimentin. *Science Translational Medicine*, **14**, eabn7571. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn7571>
- [30] Zheng, D., Liu, J., Piao, H., Zhu, Z., Wei, R. and Liu, K. (2022) ROS-Triggered Endothelial Cell Death Mechanisms: Focus on Pyroptosis, Parthanatos, and Ferroptosis. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article ID: 1039241. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1039241>
- [31] Niu, B., Liao, K., Zhou, Y., *et al.* (2021) Application of Glutathione Depletion in Cancer Therapy: Enhanced ROS-Based Therapy, Ferroptosis, and Chemotherapy. *Biomaterials*, **277**, Article ID: 121110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121110>
- [32] Feng, H., Schorpp, K., Jin, J., *et al.* (2020) Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker. *Cell Reports*, **30**, 3411-3423.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.049>
- [33] Park, E. and Chung, S.W. (2019) ROS-Mediated Autophagy Increases Intracellular Iron Levels and Ferroptosis by Ferritin and Transferrin Receptor Regulation. *Cell Death & Disease*, **10**, Article No. 822. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2064-5>
- [34] Chen, X., Kang, R., Kroemer, G. and Tang, D. (2021) Broadening Horizons: The Role of Ferroptosis in Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **18**, 280-296. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00462-0>
- [35] Chen, P.H., Wu, J., Ding, C.C., *et al.* (2020) Kinome Screen of Ferroptosis Reveals a Novel Role of ATM in Regulating Iron Metabolism. *Cell Death & Differentiation*, **27**, 1008-1022. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0393-7>
- [36] Mitchell, A.V., Wu, J., Meng, F., *et al.* (2022) DDR2 Coordinates EMT and Metabolic Reprogramming as a Shared Effector of FOXQ1 and SNAI1. *Cancer Research Communications*, **2**, 1388-1403. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-22-0013>

- [37] Lin, C.C., Yang, W.H., Lin, Y.T., *et al.* (2021) DDR2 Upregulation Confers Ferroptosis Susceptibility of Recurrent Breast Tumors through the Hippo Pathway. *Oncogene*, **40**, 2018-2034. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01676-x>
- [38] Aldana-Masangkay, G.I., Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., *et al.* (2011) Tubacin Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Leukemia & Lymphoma*, **52**, 1544-1555. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.570821>