

# 重楼皂苷 VII 通过 SOHLH1 诱导骨肉瘤铁死亡抑制肿瘤进展

肖丹庭<sup>1</sup>, 唐海军<sup>1</sup>, 杨明秀<sup>1</sup>, 滕洪材<sup>1</sup>, 梁积铭<sup>1</sup>, 谢天裕<sup>2</sup>, 冯文字<sup>3</sup>, 刘尚玉<sup>1</sup>, 戴薇<sup>1</sup>, 李河柠<sup>4</sup>, 刘云<sup>1</sup>  
广西医科大学第一附属医院<sup>1</sup>脊柱骨病外科,<sup>2</sup>创伤骨科手外科,<sup>4</sup>肿瘤科, 广西南宁 530021;<sup>3</sup>广西医科大学第二附属医院骨关节疾病外科, 广西南宁 530021

**摘要:**目的 探讨重楼皂苷 VII(PP7)的抗骨肉瘤疗效及其分子机制。方法 采用超高效液相色谱串联质谱分析鉴定重楼的主要成分。建立骨肉瘤患者来源异种移植瘤(PDX)模型,将构建的6只PDX模型的裸鼠随机分为实验组和对照组,3只/组。实验组接受2 mg/kg PP7灌胃(2 d/次,共用药28 d),对照组给予等量生理盐水,测量两组肿瘤的体积和质量。在143B和HOS细胞中,采用CCK-8法检测不同浓度PP7(0、1.25、2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )对肿瘤细胞增殖的影响并确定起效浓度。通过Transwell实验分析PP7对细胞迁移和侵袭的作用。结合单细胞转录组测序(scRNA-seq)、批量转录组测序(bulk RNA-seq)和分子对接预测PP7的作用靶点,采用Western blotting验证PP7对该靶点的调控作用。构建沉默SOHLH1的骨肉瘤细胞,设置对照组、PP7干预组(5  $\mu\text{mol/L}$ )、沉默SOHLH1组及PP7+沉默SOHLH1组,分别检测各组细胞迁移、侵袭能力以及铁死亡相关指标ROS和LPO的水平。结果 质谱分析发现PP7为重楼主要活性成分之一。体内实验中,PP7处理组肿瘤体积与质量均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。体外实验显示,PP7以浓度依赖方式抑制骨肉瘤细胞增殖,并在5  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下抑制细胞增殖( $P < 0.05$ ),且该浓度抑制细胞迁移与侵袭( $P < 0.05$ )。多组学分析确定SOHLH1为PP7潜在作用靶点。Western blotting证实PP7可上调SOHLH1 mRNA及蛋白表达( $P < 0.05$ )。SOHLH1沉默削弱了PP7对细胞迁移、侵袭的抑制作用,并减弱了PP7诱导的铁死亡( $P < 0.05$ )。结论 PP7通过上调SOHLH1表达,诱导骨肉瘤细胞铁死亡,进而抑制其恶性进展。

**关键词:**骨肉瘤;重楼皂苷 VII;铁死亡;单细胞转录组测序;PDX模型

## Polyphyllin VII inhibits osteosarcoma xenograft growth in mice by inducing ferroptosis via upregulating SOHLH1

XIAO Danting<sup>1</sup>, TANG Haijun<sup>1</sup>, YANG Mingxiu<sup>1</sup>, TENG Hongcai<sup>1</sup>, LIANG Jiming<sup>1</sup>, XIE Tianyu<sup>2</sup>, FENG Wenyu<sup>3</sup>, LIU Shangyu<sup>1</sup>, DAI Wei<sup>1</sup>, LI Hening<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Spinal Bone Disease, <sup>2</sup>Department of Traumatic Orthopedics and Hand Surgery, <sup>4</sup>Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; <sup>3</sup>Department of Bone and Joint Diseases Surgery, Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China

**Abstract: Objective** To investigate the inhibitory effect of polyphyllin VII (PP7) on osteosarcoma xenograft growth in mice and explore the underlying molecular mechanism. **Methods** Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used to analyze the main active components of Paris polyphylla. Six nude mice bearing patient-derived xenograft (PDX) were randomized into two groups for treatment with 2 mg/kg PP7 gavage or saline every other day for 28 days, and the changes in tumor volume and mass were measured. In cultured 143B and HOS cells, the effect of PP7 treatment (0, 1.25, 2.5, 5, and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) on cell proliferation was assessed with CCK-8 assay, and Transwell assays were employed to examine the changes in cell migration and invasion. The target of PP7 was predicted by integrated analyses with single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), bulk RNA sequencing (bulk RNA-seq) and molecular docking and verified using Western blotting. In osteosarcoma cells transfected with SOHLH1 siRNAs or a negative control sequence, the effects of PP7 treatment (5  $\mu\text{mol/L}$ ) on cell migration, invasion, ferroptosis, reactive oxygen species (ROS) production and lipid peroxidation (LPO) were analyzed. **Results** PP7 was identified as one of the major active constituents of Paris polyphylla. In the tumor-bearing mice, PP7 treatment significantly lower the tumor volume and mass. In 143B and HOS cells, PP7 concentration-dependently inhibited cell proliferation, and at 5  $\mu\text{mol/L}$ , PP7 significantly inhibited cell proliferation, migration and invasion. Multi-omics analysis identified SOHLH1 as a potential target of PP7, and Western blotting confirmed that PP7 upregulated SOHLH1 expressions at both the mRNA and protein levels. SOHLH1 silencing obviously attenuated the inhibitory effects of PP7 on cell migration and invasion and reduced PP7-induced ferroptosis. **Conclusion** PP7 suppresses osteosarcoma xenograft growth in mice by inducing ferroptosis via upregulating SOHLH1 expression.

**Keywords:** osteosarcoma; polyphyllin VII; ferroptosis; single-cell RNA sequencing; PDX model

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,主要发生于儿童和青少年,其年龄标准化发病率在10~19岁人群中约为6/1 000 000<sup>[1]</sup>。直至20世纪70年代,接受手术治

疗的患者生存率仍然较低。随着术前新辅助化疗、手术及术后辅助化疗的综合治疗策略的应用,骨肉瘤患者的5年生存率从20%提升至60%以上<sup>[2-4]</sup>。然而,化疗耐药仍然是骨肉瘤患者治疗失败的主要原因之一。过去40年来,骨肉瘤患者的总体生存率未见显著提高,仍有30%~40%的患者无法从现有联合治疗中获益<sup>[5,6]</sup>。此外,包括顺铂、多柔比星、大剂量甲氨蝶呤和异环磷酰胺

收稿日期:2025-08-10

基金项目:广西卫生健康委员会自筹研究项目(Z-A20230681)

作者简介:肖丹庭,在读硕士研究生,E-mail: szsyxdt@163.com

通信作者:刘云,博士,主任医师,E-mail: liuyun200450250@sina.com

在内的经典化疗药物常引发诸多急性或慢性毒副作用,导致患者不得不终止用药<sup>[7-9]</sup>。因此,开发具有低毒副作用的新型药物至关重要。

近年来,多种具有抗癌活性的天然植物提取物陆续被分离和鉴定。中医药及其活性成分因其多靶点作用和低毒副作用的优势,在抗肿瘤研究中显示出良好潜力<sup>[10,11]</sup>。重楼皂苷 VII(PP7)是从重楼中提取的皂苷类化合物。重楼在中医临床中广泛应用于治疗疔疮、痈肿、咽喉肿痛、蛇虫咬伤、疼痛及惊风抽搐等症。云南重楼所含皂苷成分已被证实具有抗肿瘤、镇痛及镇静作用<sup>[12]</sup>。多项报道表明,PP7对多发性骨髓瘤<sup>[13]</sup>、肝癌<sup>[14]</sup>、肺癌<sup>[15]</sup>、人口腔鳞状细胞癌<sup>[16]</sup>以及骨肉瘤<sup>[16]</sup>等多种恶性肿瘤均表现出抑制效果<sup>[17]</sup>。课题组前期研究显示,PP7可通过调节U2OS细胞中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平,并经由JNK信号通路诱导细胞凋亡与自噬,从而发挥抗肿瘤作用<sup>[17]</sup>。然而,目前关于PP7抑制骨肉瘤增殖的研究仍然空白,其潜在的分子机制尚不明确。基于此,本研究拟通过患者来源的异种移植(PDX)模型及体外实验,系统评估PP7在骨肉瘤中的抗肿瘤活性,并结合单细胞转录组测序(scRNA-seq)与批量转录组测序(bulk RNA-seq)、分子对接等技术,筛选并验证其潜在作用靶点,旨在阐明PP7抑制骨肉瘤的具体分子机制,为PP7的临床应用及骨肉瘤治疗新策略的开发提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、主要试剂与仪器

重楼饮片购自北京同仁堂。PP7购自北京索拉生物科技有限公司,纯度≥98%。骨肉瘤细胞系143B、HOS、MG63、SAOS2与U2OS购自中国科学院细胞库。人成骨细胞系hFOB1.19(OB细胞)用作qRT-PCR对照。实验所用NOD/ShiLtJGpt-Prkdcem26Cd52Il2rgem26Cd22/Gpt(NCG)小鼠2只(雌性,4周龄,体质量18~20g)及BALB/c-nu裸鼠6只(雌性,4周龄,体质量16~20g)购自江苏集萃药康生物科技有限公司。将肿瘤大小相近的裸鼠随机分为PP7用药组和对照组,3只/组。实验程序符合动物研究伦理原则,并得到广西医科大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批号:2024-E248-01)。

主要试剂:DMEM/F-12(1:1)、DMEM与MCoys 5A培养基、胎牛血清、0.025%胰蛋白酶(Gibco);4%多聚甲醛、1%结晶紫染色液、青霉素/链霉素(北京索莱宝科技有限公司);RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas);SYBR Green PCR试剂盒、DCFH-DA工作液(Sigma-Aldrich);CCK-8试剂(Dojindo);Transwell小室、Matrigel基质胶(Corning);引物、Sangon™ RNA TransMate转染试剂(生工生物);

SOHLH1基因的siRNA(上海生工);质粒(Genechem);Lipofectamine™ 3000试剂(Invitrogen);伊莱瑞科脂质过氧化物(LPO)荧光检测试剂盒(Elabscience)。RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PCR逆转录试剂(Takara);SYBR Green(Roche);蛋白质提取试剂盒(NCM Biotech);一抗SOHLH1、二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(Proteintech);β-Tubulin(ZEN-BIOSCIENCE)。

主要仪器:Xevo G2-XS Q-TOF质谱系统、ACQUITY UPLCTM系统(沃特世);7500实时荧光定量PCR系统(Applied Biosystems);酶标仪(BioTek);倒置荧光显微镜(Olympus);CO<sub>2</sub>培养箱(Thermo Fisher)。

### 1.2 方法

1.2.1 质谱法鉴定 PP7 干燥重楼药材经粉碎过50目筛后备用。取0.5g重楼粉末,加入35mL 95%乙醇,90℃回流提取30min。提取液经水浴蒸发并浓缩至100mg/mL,0.22 μm滤膜过滤后进样。采用超高效液相色谱串联质谱分析(UPLC-ESI-QTOF-MS/MS)技术,色谱分离在HSS T3柱(35℃)上进行,流速0.3 mL/min,进样量10 μL,流动相为A(水/甲酸,99.9/0.1, v/v)和B(乙腈),按既定梯度洗脱。质谱数据采集范围50~1500,正负离子模式扫描。

1.2.2 PDX模型构建与体内药效评估 本研究所有涉及人体样本的操作均获得了广西医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(伦理批号:2024-E248-01),并严格遵循赫尔辛基宣言。研究所需的新鲜骨肉瘤组织均采集于手术中切除的标本,并立即置于冷藏保存,后续立即用于构建PDX模型,以进行体内药效学评价和后续分子机制研究。取新鲜骨肉瘤组织,切割成3 mm×3 mm×3 mm组织块,移植于NCG小鼠右侧肋脊部皮下,将NCG小鼠置于SPF级环境中饲养,连续传代3代。将第3代的肿瘤组织块移植至BALB/c-nu裸鼠,设立实验组予PP7干预(2 mg/kg,灌胃,2 d/次,共28 d)和对照组予以等量生理盐水,3只/组。每2 d测量小鼠体质量,每周测量肿瘤体积(肿瘤体积=0.5×长×宽<sup>2</sup>)。实验终点处死小鼠,剥离肿瘤组织进行后续bulk RNA-seq分析。

1.2.3 细胞培养 hFOB1.19细胞培养于DMEM/F-12(1:1)培养基(含10%FBS、1%青霉素/链霉素)和骨肉瘤细胞系143B、HOS、MG63培养于DMEM培养基(含10%FBS、1%青霉素/链霉素),SAOS2与U2OS细胞培养于MCoys 5A培养基(SAOS2含15%FBS,U2OS含10%FBS,均含1%青霉素/链霉素)。所有细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,使用0.025%胰蛋白酶消化传代。

1.2.4 细胞增殖、迁移与侵袭实验 采用CCK-8法检测细胞增殖:将细胞密度为5000/孔接种于96孔板,设置不同浓度PP7(0.125、2.5、5、10 μmol/L)干预48 h后,每孔加

入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 孵育 1 h, 测定  $A_{450\text{ nm}}$ 。

采用 Transwell 实验评估迁移与侵袭能力: 调整细胞密度至  $5 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ , 取 100  $\mu\text{L}$  悬液加入 Transwell 上室, 下室加入 600  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的完全培养基作为趋化剂, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 48 h。侵袭实验需预先在 Transwell 小室铺设 50  $\mu\text{L}$  Matrigel 基质胶, 并孵育 30 min 形成一层膜。培养 48 h 后, 轻轻吸走培养基, 加入细胞用 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 min, 用 PBS 清洗 3 次, 然后用 1% 结晶紫染色液染色 15 min, 再次用 PBS 清洗 3 次。迁移、侵袭实验均需用棉签轻轻擦拭上室膜表面未迁移细胞, 侵袭实验需加擦拭小室内基质胶膜的部分。自然风干后, 在正置显微镜下观察并拍照计数。

1.2.5 Western blotting 采用 Western blotting 检测 143B 和 HOS 细胞中 SOHLH1 蛋白在 PP7 处理前后的表达水平。使用蛋白质提取试剂盒提取细胞总蛋白, 通过 SDS-PAGE 进行分离, 随后利用电转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上。膜在室温封闭 1 h 后, 与 SOHLH1 一抗 (1:1000) 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 随后在室温下与相应的 HRP 标记二抗 (1:5000) 孵育 1 h。以  $\beta$ -Tubulin (1:5000) 作为内参对照。使用增强化学发光试剂 (Epizyme Biotech) 显影, 并通过 ImageJ 软件对条带进行光密度定量分析。

1.2.6 细胞转染实验 根据 Sangon<sup>TM</sup> RNA TransMate 转染试剂说明书并通过 qRT-PCR 验证沉默效率, 确定了针对 SOHLH1 基因的 siRNA 在细胞系中的最佳工作浓度。设计并合成了 3 条针对 SOHLH1 不同靶点的 siRNA 序列, 并通过 qRT-PCR 筛选其沉默效率。质粒的过表达效率根据 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 试剂和后续 qRT-PCR 的说明进行验证。并按照制造商的说明转染过表达质粒, 瞬时转染 143B 和 HOS 细胞, 转染 48 h 后收细胞进行后续实验, 如 qRT-PCR、迁移与侵袭、LPO、ROS 等功能实验。

1.2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 提取细胞总 RNA 并逆转为 cDNA。使用 SYBR Green PCR 试剂盒, 在 7500 实时荧光定量 PCR 系统上进行反应。以 SOHLH1 为靶基因, GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算基因相对表达量。

1.2.8 细胞活性氧 (ROS) 与脂质过氧化物 (LPO) 检测 将 143B 和 HOS 细胞以  $2 \times 10^5$  孔接种于 24 孔板, 按实验设计分组干预 48 h。ROS 检测: 加入 500  $\mu\text{L}$  孔稀释后的 DCFH-DA 工作液, 避光孵育 30 min, 无血清培养基清洗后于荧光显微镜下观察。LPO 检测: 使用 Elabscience 脂质过氧化物荧光法测试盒检测细胞内的 LPO。按照说明书进行操作, 除去培养基, 用工作液洗涤细胞 2~3 次。加入配好的浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的 C11-BODIPY 581/591 荧光探针, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育细胞 45~60 min。孵育结束后用工作液洗涤细胞 2~3 次, 以充分

去除未进入细胞内的荧光探针。吸除液体后, 在倒置荧光显微镜下观察细胞并采集图像。使用 Image-J 统计每组荧光强度。

1.2.9 Bulk RNA-seq 与 scRNA-seq 分析 PDX 肿瘤组织 bulk RNA-seq: 将 PDX 肿瘤组织消化制备成细胞悬液后提取总 RNA。以 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 为起始模板, 利用逆转录酶将 RNA 模板转化为 cDNA。在双链 cDNA 的 3' 末端添加腺苷酸尾并连接接头。使用 PCR 对连接接头的 DNA 片段进行扩增, 通过 Qubit 荧光定量仪对构建完成的文库进行定量与质控。文库委托上海吉凯基因医学科技股份有限公司使用 Illumina Novaseq 3000 测序仪按制造商说明书进行测序。单细胞 RNA 测序数据分析: 单细胞 RNA 测序数据引自我们前期的研究 (该研究收集了 6 例骨肉瘤患者的肿瘤组织进行单细胞 RNA 测序)<sup>[18]</sup>。所有患者均在样本获取前未接受化疗或放疗。样本经消化后通过油包水系统构建文库并测序。上游分析使用 Cell Ranger 软件完成, 相关数据已上传至基因表达综合数据库 (GEO), 登录号为 GSE162454。同时从 GEO 数据库选取 GSE169396 单细胞数据作为正常对照队列。使“seurat”R 包整合 2 个数据集并剔除低质量细胞, 筛选标准为:  $n\text{Feature\_RNA} > 300$  且  $n\text{Feature\_RNA} < 4500$ , 线粒体基因百分比  $< 10\%$ 。为减少不同操作者、时间及仪器引起的实验误差, 采用“harmony”包对质控后数据进行批次效应校正。对处理后的数据应用主成分分析进行线性降维, 通过“ElbowPlot”确定后续分析所用的主成分维度。重点采用 t-SNE 与 UMAP 算法探索并可视化全体细胞的聚类分类。随后选择 ALPL、RUNX2 和 IBSP 作为成骨样细胞的标记基因定义细胞亚群。最终识别正常队列与骨肉瘤队列成骨细胞中的差异基因, 并将其作为骨肉瘤的潜在作用靶点。差异基因筛选阈值为校正  $P < 0.05$ 。上述所有统计分析和数据可视化均采用 R4.1.0 软件完成。

1.2.10 分子对接 选择 SOHLH1 与 PP7 进行分子对接。从 PubChem 数据库获取 PP7 的 3D 结构, 从 AlphaFold 数据库获取 SOHLH1 蛋白结构。使用 PyMOL 和 AutoDock Tools 1.5.7 处理蛋白 (去除配体、水分子, 加氢), 通过 OpenBabel 处理配体, 均保存为 pdbqt 格式。采用 QuickVina-W 方法进行分子对接<sup>[19]</sup>, 使用 PyMOL 和 PLIP 在线工具进行结果可视化 (<https://plip-tool.biotech.tu-dresden.de>)。

1.2.11 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析。实验数据以均数  $\pm$  标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重楼药材的质谱分析结果

重楼提取物的 UPLC-ESI-QTOF-MS/MS 分析结

果如图1所示。在正、负离子模式下分别获得了具有鉴定意义的基峰离子图谱(图1A、B)当保留时间为38.38 min时检测到PP7(图1A)。基于MassLynx V4.2软件及人类代谢组数据库5.0对色谱图进行一级和二级分析,最终鉴定出23种成分(表1、2)。其中,PP7被确定为正离子模式下重楼的主要成分之一,其分子式为 $C_{51}H_{84}O_{22}$ ,相对分子质量为1049.1990(图1C)。

### 2.2 PP7体内抑制骨肉瘤生长

在PDX模型中,与对照组相比,PP7给药组的骨肉瘤体积与质量均减小( $P<0.05$ ,图2)。

### 2.3 PP7体外抑制骨肉瘤细胞增殖、侵袭与迁移

CCK-8法检测结果显示,与0  $\mu\text{mol/L}$ 组相比,

1.25  $\mu\text{mol/L}$ 和2.5  $\mu\text{mol/L}$ 的PP7处理对143B及HOS细胞的增殖无影响;而当浓度升至5  $\mu\text{mol/L}$ 和10  $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖被抑制( $P<0.05$ ,图3A、B),并确定5  $\mu\text{mol/L}$ 为后续功能实验的适宜浓度。Transwell实验显示,5  $\mu\text{mol/L}$  PP7处理可降低143B和HOS细胞的迁移数量( $P<0.001$ )与侵袭数量( $P<0.05$ ,图3C~F)。

### 2.4 PP7可能通过SOHLH1发挥抗骨肉瘤作用

对6例骨肉瘤患样本(29 278个细胞)与4例正常对照样本(24 625个细胞)的单细胞进行聚类,共识别出13个细胞亚群;其中,高表达成骨标志基因ALPL、RUNX2与IBSP的细胞簇被注释为成骨样细胞(图4A、B)。比较肿瘤与正常组织中的成骨样细胞,鉴定出2442个差

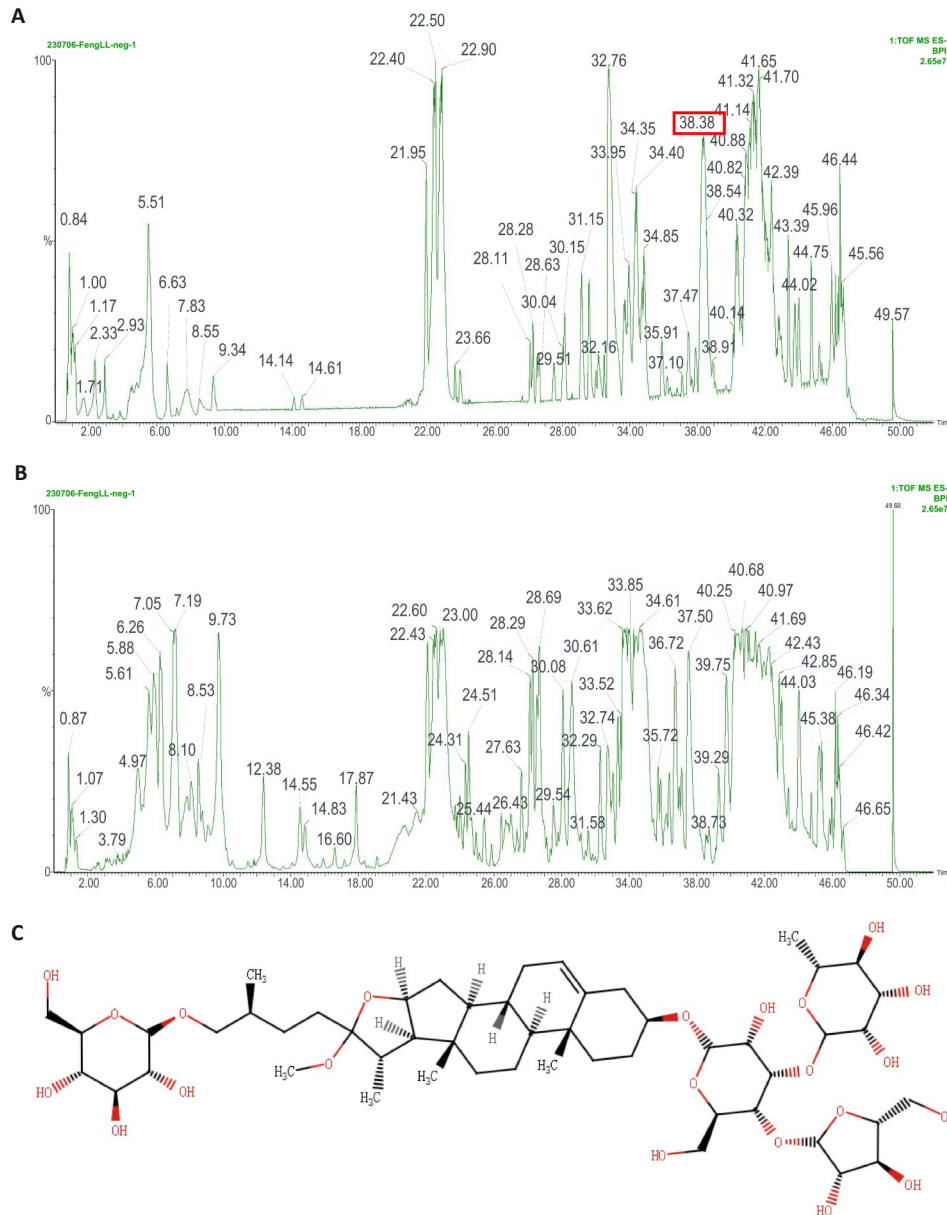


图1 重楼药材的质谱分析结果

Fig.1 Mass spectrometry results for *P. polyphylla*. A: Base peak ion plots of *P. polyphylla* in positive ion modes. PP7 was detected at the retention time of 38.38 min (red box). B: Base peak ion plots of *P. polyphylla* in negative ion modes. C: Molecular formula of PP7.

表1 正离子模式下的鉴定结果

Tab.1 Identification results in the positive ion mode

No.	Retention time (min)	Accurate molecular weight	Ionic form	ppm	Compound name	Molecular formula	First and second level fragments
1	1.798	402.4792	M+K	-3.17	Acetyl tributyl citrate	C20H34O8	441.5761, 199.0983, 215.0932, 229.142, 257.1379, 259.1531, 267.123, 287.1467, 299.1497, 303.18014
2	1.982	610.5175	M+H	-1.96	Rutin	C27H30O16	611.5242, 123.0442, 245.0442, 593.146,
3	4.618	274.3978	M+H	-2.54	Nandrolone	C18H26O2	275.4051, 83.0852, 131.0843, 153.1279, 177.1264, 275.2006
4	14.503	855.017	M+H	2.57	Polyphyllin I	C44H70O16	856.0271, 428.5142,
5	21.452	592.7606	M+H	1.35	Agavoside A	C33H52O9	593.7685, 123.1132, 291.1961, 475.3434, 519.3343,
6	21.687	903.0583	M+H	7.96	Trigofenoside A	C45H74O18	904.059, 577.3734, 683.4028, 753.4484, 829.4611
7	25.211	293.3663	M+Na	4.43	Anastrozole	C17H19N5	316.3553, 55.0295, 240.1509, 173.1073, 187.1236, 225.1122
8	25.474	738.9018	M+H	-1.89	Polyphyllin VI	C39H62O13	739.9083, 433.2632, 578.383, 397.3106
9	27.384	430.62	M+H	3.94	Pennogenin	C27H42O4	431.6296
10	27.499	414.6206	M+H	0.96	Diosgenin	C27H42O3	415.6289, 81.0693, 105.0697
11	28.371	480.6341	M+H	9.34	Crustecdysone	C27H44O7	481.6467, 59.0493, 127.1128, 279.1596, 305.1737, 307.1907,
12	28.877	191.1867	M+H	5.72	Carbendazim	C9H9N3O2	192.1957
13	29.455	1015.1848	M+H	-2.85	Polyphyllin B	C51H82O20	1016.1898, 293.1246, 723.4232
14	29.455	1015.1848	M+H	-2.85	Polyphyllin E	C51H82O20	1016.1898
15	29.455	1015.1848	M+H	5.51	Polyphyllin F	C51H82O20	1016.1983
16	30.536	869.0436	M+H	1.72	Dioscin	C45H72O16	870.0534, 89.0600, 121.1013, 127.0393, 147.0616, 249.1868, 291.1082, 457.3314
17	32.939	696.8651	M+H	9.03	Momordicoside E	C37H60O12	697.8793, 489.3545
18	33.402	404.4105	M+H	0.34	Kaempferol 7-O-Neohesperidoside	C27H30O15	595.5262, 223.0970, 373.1257
19	37.217	323.5133	M+H	-0.31	Linoleoyl Ethanolamide	C20H37NO2	324.5211, 83.0849
20	37.434	278.3435	M+K	-1.89	Dibutyl Phthalate	C16H22O4	317.4412
21	37.434	317.5072	M+H	0.63	Phytosphingosine	C18H39NO3	318.5153, 65.038, 69.0704
22	38.378	1049.1990	M+H	-4.00	Polyphyllin VII	C51H84O22	1050.2032, 721.4158, 575.3579,
23	51.839	196.2429	M+H	3.55	Loliolide	C11H16O3	197.2516, 67.0547, 111.0446

异表达基因;对PP7处理组与对照组的PDX模型的bulk RNA-seq数据进行比较,识别出414个上调的差异表达基因。两者取交集后,筛选出11个PP7的潜在作用靶点(图4C)。其中,SOHLH1在PP7给药组中上调最显著(log2FoldChange=2.487,图4D)。

qRT-PCR结果显示,SOHLH1在多种骨肉瘤细胞系中普遍低表达( $P<0.01$ ,图4E)。Western blotting结果表明,PP7处理可上调143B与HOS细胞中SOHLH1的蛋白表达水平( $P<0.05$ ,图4F)。分子对接模拟显示,PP7与SOHLH1蛋白的结合能为-6.9 kcal/mol(图4G)。

### 2.5 SOHLH1对骨肉瘤细胞迁移与侵袭的影响

qRT-PCR验证结果显示,在143B细胞中,si-SOHLH1-496的沉默效率最高( $P<0.001$ ,图5A);在HOS细胞中,si-SOHLH1-374的沉默效率最佳( $P<0.001$ ,图5B)。随后,Transwell实验结果显示,在143B细胞中,与对照组相比,过表达SOHLH1(oe-SOHLH1)组的迁移与侵袭细胞数量减少( $P<0.01$ ),而敲低

SOHLH1(si-SOHLH1)组的迁移与侵袭细胞数量则增加( $P<0.01$ ,图5C~E)。在HOS细胞中观察到一致的趋势:oe-SOHLH1组的迁移( $P<0.001$ )与侵袭( $P<0.01$ )细胞数量减少,而si-SOHLH1组的迁移与侵袭细胞数量增加( $P<0.01$ ,图5F~H)。

### 2.6 PP7通过上调SOHLH1抑制骨肉瘤细胞的迁移与侵袭能力

qRT-PCR分析显示,与对照组相比,经5  $\mu\text{mol/L}$  PP7处理后,143B和HOS中SOHLH1的表达水平升高( $P<0.01$ ,图6A、B)。功能拯救实验结果表明,PP7均使143B细胞的迁移与侵袭数量减少(均 $P<0.01$ )。si-SOHLH1则增加了其迁移数( $P<0.05$ )和侵袭数( $P<0.01$ );当沉默SOHLH1基础上加药物干预(PP7+si-SOHLH1组),迁移( $P<0.01$ )和侵袭( $P<0.05$ )的细胞数较PP7组回升(图6C、D)。在HOS细胞中同样观察到一致的趋势:PP7减少细胞迁移( $P<0.001$ )与侵袭( $P<0.01$ )的数量,而si-SOHLH1则增加迁移( $P<0.05$ )

表2 负离子模式下的鉴定结果

Tab.2 Identification results in the negative ion mode

No.	Retention time (min)	Accurate molecular weight	Ionic form	ppm	Compound name	Molecular formula	First and second level fragments
1	6.609	402.4792	M-H	8.97	Acetyl Tributyl Citrate	C20H34O8	401.4748, 245.103, 255.1215, 289.0943
2	7.238	430.62	M-H	-1.40	Pennogenin	C27H42O4	429.6114
3	10.321	610.5175	M+Cl	8.36	Rutin	C27H30O16	645.9759, 163.0600, 193.0131
4	11.516	414.6206	M+Cl	3.55	Diosgenin	C27H42O3	450.0752
5	14.868	738.9018	M+Cl	4.52	Polyphyllin VI	C39H62O13	774.3583
6	21.72	592.7606	M-H	7.60	Agavoside A	C33H52O9	591.7571, 73.0284, 315.2324, 355.2267, 359.2231, 413.3022
7	26.119	191.1867	M-H	1.58	Carbendazim	C9H9N3O2	190.1790, 104.0244, 158.0367
8	29.339	594.5181	M-H	0.74	Kaempferol 7-O-Neohesperidoside	C27H30O15	593.5102, 111.0446, 251.0915, 265.0710, 375.1415
9	29.917	696.8651	M+Cl	2.32	Momordicoside E	C37H60O12	732.3134, 121.0515, 341.2867, 505.3542, 605.381
10	34.047	317.5072	M-H	-8.21	Phytosphingosine	C18H39NO3	316.4966, 352.9604
11	34.395	480.6341	M+Cl	0	Crustecdysone	C27H44O7	516.0871, 75.0456, 99.0812, 115.0761, 141.0934, 145.0868, 291.1613, 301.1825, 445.2586
12	36.535	903.0583	M+Cl	0.53	Trigofenoside A	C45H74O18	938.5118, 547.3687, 593.3664, 709.4143
13	40.653	196.2429	M-H	6.15	Loliolide	C11H16O3	195.2362, 179.0700, 195.1020
14	41.316	278.3435	M+Cl	-6.05	Dibutyl Phthalate	C16H22O4	313.7946, 55.0548, 147.0078, 167.034, 183.1388
15	42.043	869.0436	M-H	-3.34	Dioscin	C45H72O16	868.0327, 101.0238, 557.3476, 575.3569
16	45.297	274.3978	M-H	5.49	Nandrolone	C18H26O2	273.3914, 147.0822, 173.0955, 239.1447

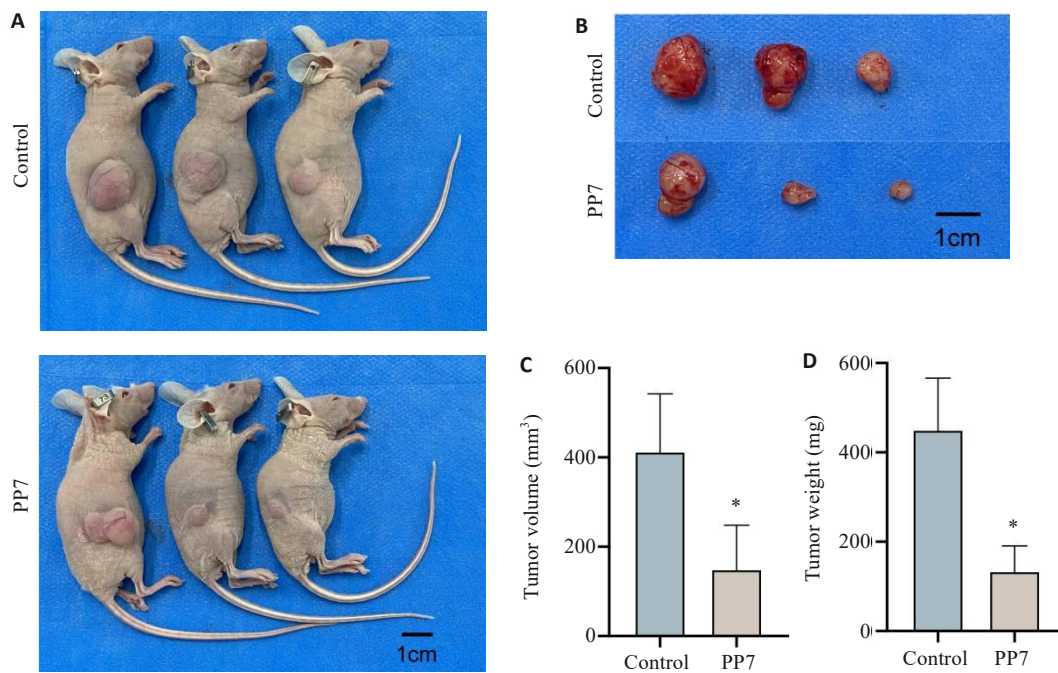


图2 PP7体内抑制骨肉瘤生长

Fig.2 PP7 inhibits osteosarcoma xenograft growth in nude mice. **A:** Macroscopic observation of osteosarcoma xenograft in nude mice after PP7 intervention. **B:** Macroscopic observation of the dissected tumors after PP7 intervention. **C:** Comparison of tumor volume between the two groups. **D:** Comparison of tumor weight between the two groups. \* $P < 0.05$  vs Control.

和侵袭的细胞数 ( $P < 0.01$ )。PP7+si-SOHLH1组迁移 ( $P < 0.01$ )和侵袭 ( $P < 0.05$ )的细胞数较PP7组回升(图6E,F)。

2.7 PP7可能通过上调SOHLH1诱导骨肉瘤细胞铁死亡

在143B细胞中,与对照组相比,si-SOHLH降低了

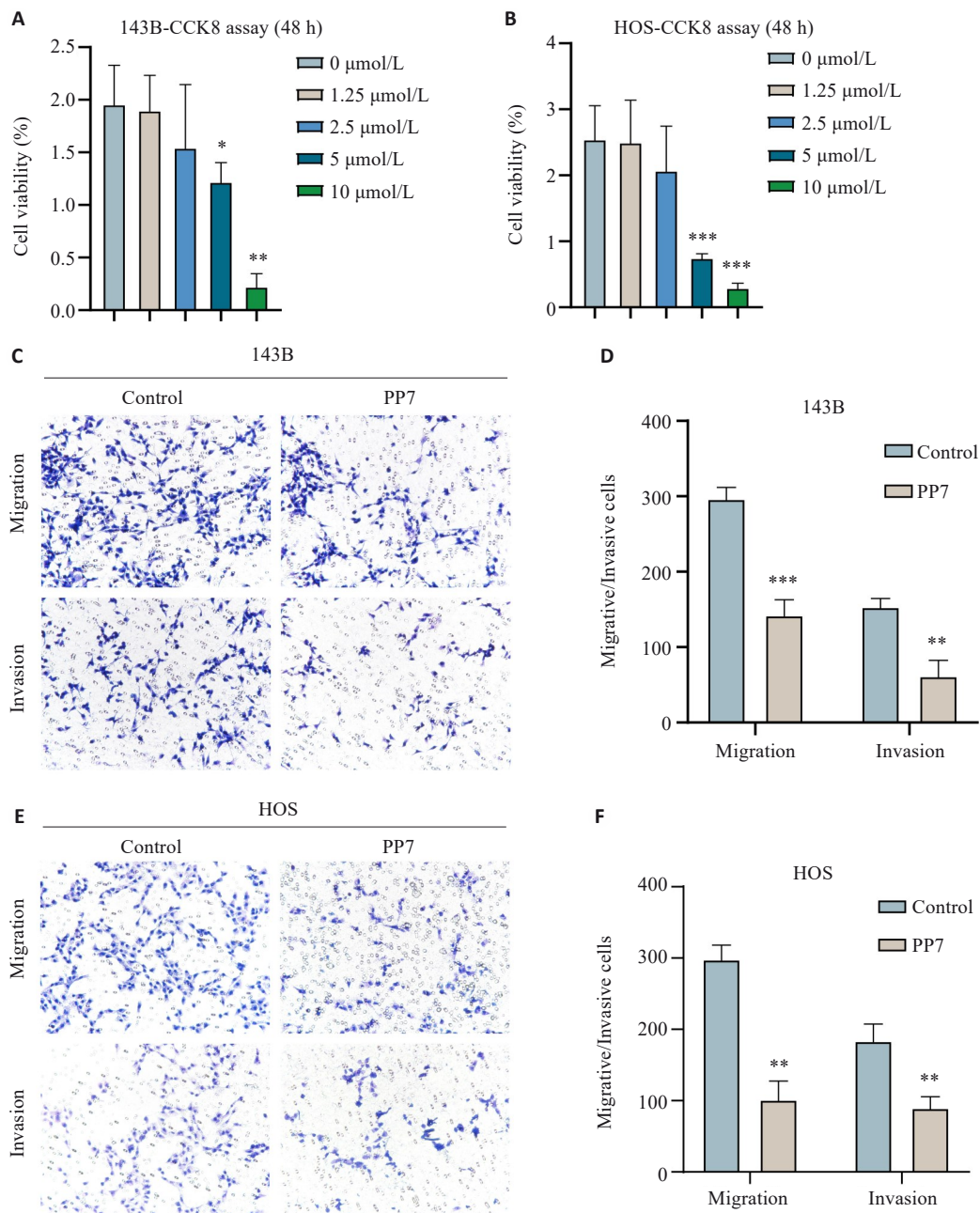


图3 PP7体外可抑制骨肉瘤细胞增殖、侵袭与迁移  
 Fig.3 PP7 inhibits proliferation, invasion, and migration of osteosarcoma cells *in vitro*. **A, B**: Results of CCK-8 assay showing dose-dependent inhibition of 143B cell proliferation by PP7 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs 0 μmol/L). **C-F**: Transwell assays showing that 5 μmol/L PP7 significantly suppresses cell migration and invasion (Original magnification: ×200). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Control.

ROS 与 LPO 的水平 ( $P < 0.05$ ), 而 PP7 处理则升高了这些指标 ( $P < 0.05$ )。在 PP7 处理的同时敲低 SOHLH1 (PP7+si-SOHLH1 组), PP7 所诱导的 ROS 与 LPO 被逆转升高 ( $P < 0.01$ , 图 7A~D)。在 HOS 细胞中观察到相似的趋势: si-SOHLH1 降低了 ROS ( $P < 0.01$ ) 与 LPO 水平 ( $P < 0.05$ ), PP7 组较对照组 ROS 与 LPO 水平升高 ( $P < 0.05$ ), 而 PP7+si-SOHLH1 组的 ROS ( $P < 0.01$ ) 与 LPO 水平 ( $P < 0.05$ ) 较 PP7 组降低 (图 7E~H)。

### 3 讨论

骨肉瘤作为最常见的原发性恶性骨肿瘤, 其高侵袭性与转移率是导致患者预后不佳的主要原因, 因此亟需开发新的治疗策略。近年来, 中医药凭借其多靶点、低毒副作用的独特优势, 已成为新型抗肿瘤药物研发的重要宝库。PP7 是从中药重楼中分离的一种活性甾体皂苷, 既往研究表明 PP7 为重楼的主要药理成分之一<sup>[20]</sup>, 其在逆转化疗耐药及抑制多种肿瘤进展方面展现出巨

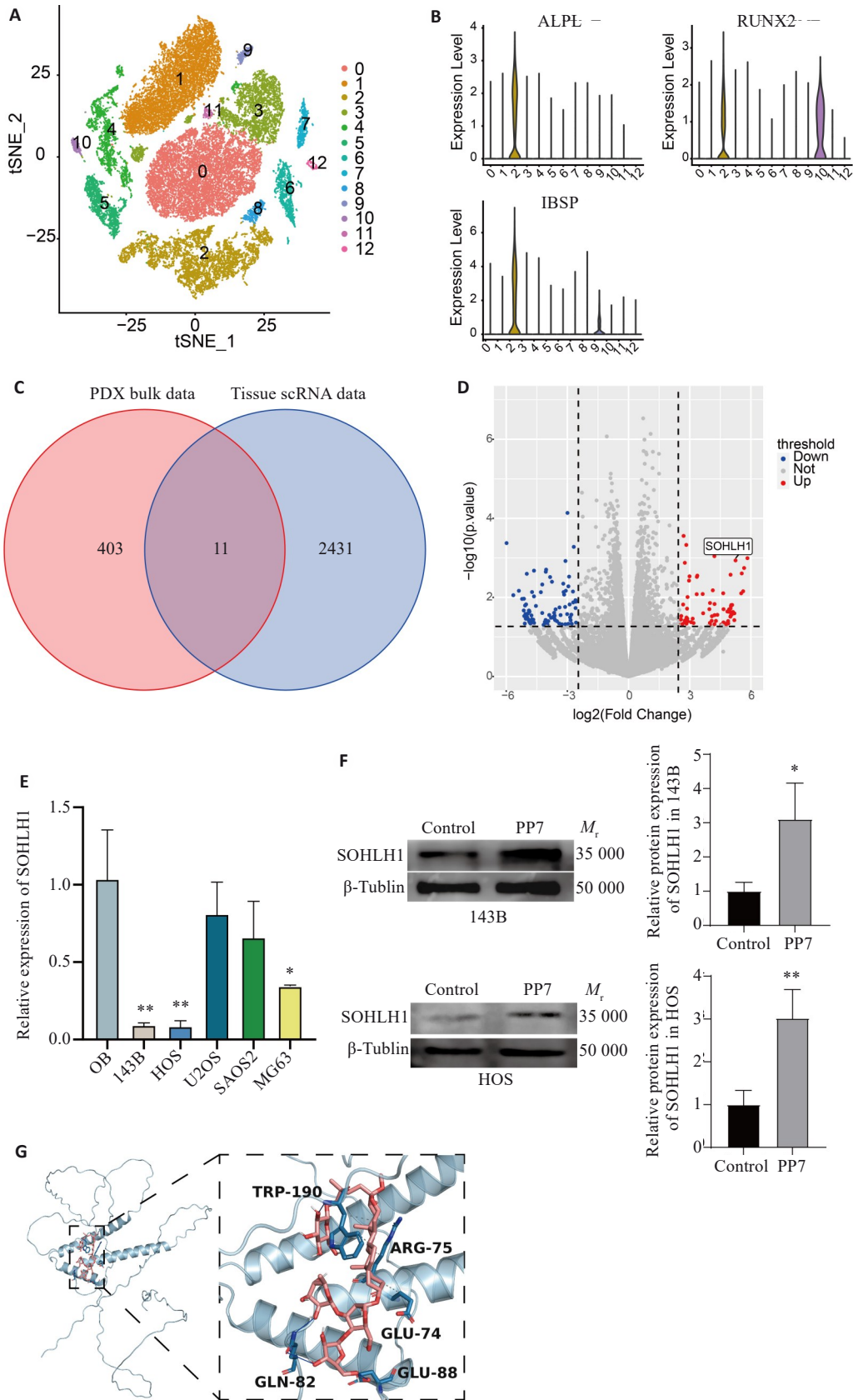


图4 PP7可能通过SOHLH1发挥抗骨肉瘤作用

Fig.4 The inhibitory effect of PP7 against osteosarcoma is mediated possibly by SOHLH1. **A:** UMAP plot of scRNA-seq data. **B:** ALPL, RUNX2, and IBSP are highly expressed in cluster 2. **C:** Intersection of bulk RNA-seq and scRNA-seq data. **D:** SOHLH1 expression is significantly upregulated in PP7-treated PDX tumors [ $\log_2(\text{fold change})=2.487$ ]. **E:** SOHLH1 is lowly expressed in osteosarcoma cell lines detected by qRT-PCR (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs OB). **F:** Western blotting showing PP7 upregulates SOHLH1 protein levels in both 143B and HOS cell lines (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs Control). **G:** The binding energy of PP7 to SOHLH1 was -6.9 kcal/mol by molecular docking.

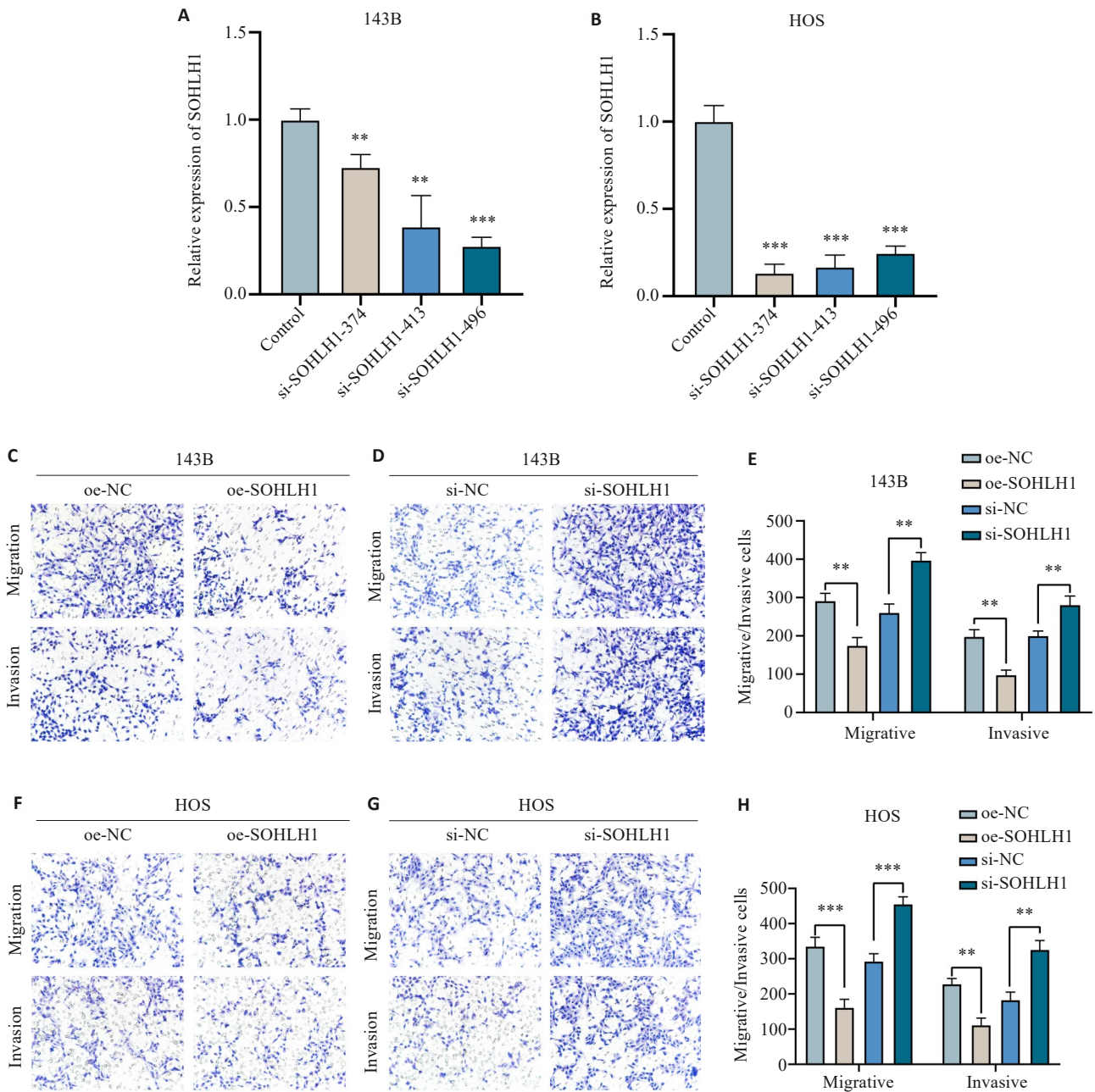


图5 SOHLH1抑制骨肉瘤迁移与侵袭

Fig.5 SOHLH1 inhibits osteosarcoma migration and invasion. **A, B:** Validation of SOHLH1 silencing efficiency by qRT-PCR in 143B (A) and HOS (B) cells transfected with specific siRNAs (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control). **C-E:** Effects of SOHLH1 overexpression or knockdown on migration and invasion abilities of 143B cells (Crystal violet staining,  $\times 200$ ). **F-H:** Effects of SOHLH1 overexpression or knockdown on migration and invasion abilities of HOS cells (Crystal violet staining,  $\times 200$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

大潜力<sup>[21-23]</sup>。同时,前期研究发现,PP7可通过调控JNK通路诱导骨肉瘤细胞凋亡与自噬<sup>[17]</sup>。除上述机制外,近期研究还揭示,PP7能够通过诱导胃癌和非小细胞肺癌中肿瘤细胞的铁死亡,进而抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[24, 25]</sup>,提示铁死亡可能是其发挥抗肿瘤效应的另一重要途径。然而,PP7能否在骨肉瘤中诱导铁死亡,其关键分子靶点是什么,以及其在体内的深层抗癌机制,目前尚不明确。

本研究采用了PDX模型的构建,该模型因其能高度保留原发肿瘤的异质性与微环境特征,被视为评估药

物疗效的“金标准”<sup>[26, 27]</sup>。本研究结果明确显示,PP7处理能显著抑制骨肉瘤PDX模型的肿瘤生长,为PP7的体内有效性提供了直接证据。在证实PP7的体内疗效后,通过整合scRNA-seq,bulk RNA-seq与分子对接技术,SOHLH1被鉴定为PP7作用于骨肉瘤的关键潜在靶点。SOHLH1位于9号染色体的q臂上。在生理状态下,SOHLH1对精子发生、卵子发生和卵泡发生至关重要<sup>[28, 29]</sup>。目前关于SOHLH1在肿瘤中的研究较少。既往研究显示,SOHLH1可通过抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路降低星形细胞瘤细胞的恶性和进展<sup>[30]</sup>,与本研究中

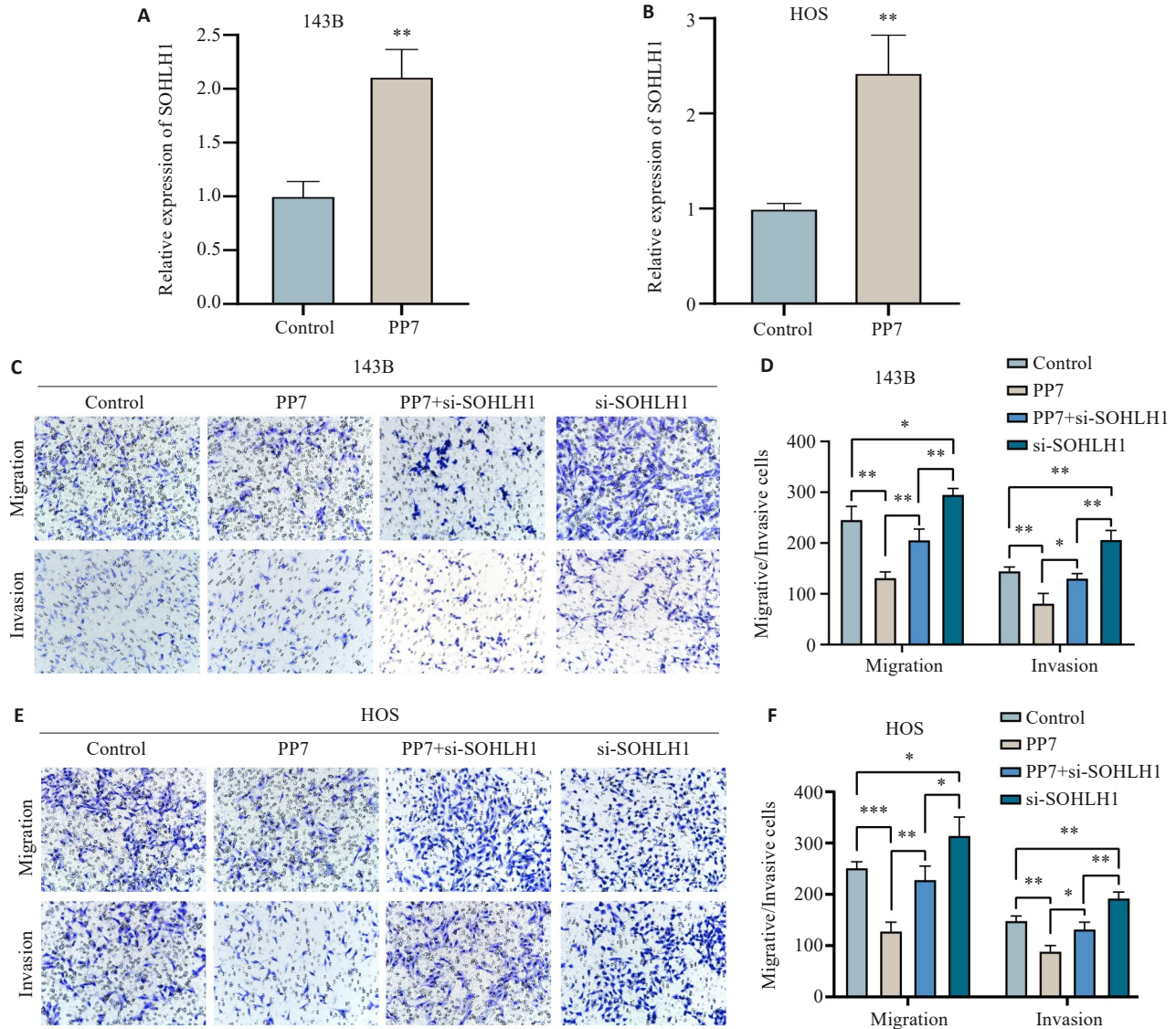


图6 PP7通过上调SOHLH1抑制骨肉瘤细胞的迁移与侵袭能力

Fig.6 PP7 inhibits migration and invasion of osteosarcoma cells by upregulating SOHLH1. A, B: SOHLH1 mRNA expression in 143B (A) and HOS (B) cells after PP7 treatment detected by qRT-PCR (\*\* $P < 0.01$  vs Control). C, D: Effects of PP7 treatment, SOHLH1 knockdown, and their combination on migration and invasion of 143B cells ( $\times 200$ ). E, F: Effects of PP7 treatment, SOHLH1 knockdown, and their combination on migration and invasion of HOS cells ( $\times 200$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

SOHLH1抑制骨肉瘤侵袭迁移的结果一致,提示SOHLH1可能在不同类型肿瘤中均发挥抑癌基因的作用。功能回复实验进一步表明,PP7的干预能够有效逆转由SOHLH1沉默所导致的骨肉瘤细胞侵袭与迁移能力增强,这证实了PP7的作用依赖于SOHLH1。本研究还发现,PP7可能通过上调SOHLH1导致骨肉瘤细胞中ROS和LPO的积累而诱导铁死亡。

铁死亡是一种由铁超载驱动的新型程序性细胞死亡,其特征是Fenton反应产生大量活性氧和脂质过氧化物,最终导致细胞膜损伤<sup>[31]</sup>,在多种全身性疾病中发挥重要作用<sup>[32,33]</sup>。与自噬和细胞凋亡不同,铁死亡是一种依赖铁和ROS的细胞死亡<sup>[34]</sup>。研究表明,化疗药物联合铁死亡诱导剂对其抗肿瘤活性具有显著的协同作用,优于单独化疗<sup>[34]</sup>。诱导铁死亡能够有效抑制骨肉瘤细

胞的恶性进展<sup>[35,36]</sup>。本研究显示,PP7干预骨肉瘤细胞后,ROS和LPO含量明显增加,这提示PP7可能通过诱导骨肉瘤细胞发生铁死亡,进而发挥其抗肿瘤作用。本研究存在以下局限性:首先,由于经费限制,本研究仅探讨了单一有效浓度,剂量效应关系有待阐明。其次,药物与分子的直接结合机制有待通过更精密的实验(如细胞热位移分析实验、表面离子共振实验等)进行验证。最后,铁死亡相关蛋白及铁离子浓度的变化,是未来研究中需要补充的关键实验证据。

综上所述,本研究首次揭示了重楼活性成分PP7能够通过上调SOHLH1的表达来抑制骨肉瘤的进展。本研究提出了PP7可能通过SOHLH1介导铁死亡这一新机制,为骨肉瘤的治疗提供了新的潜在靶点和策略。

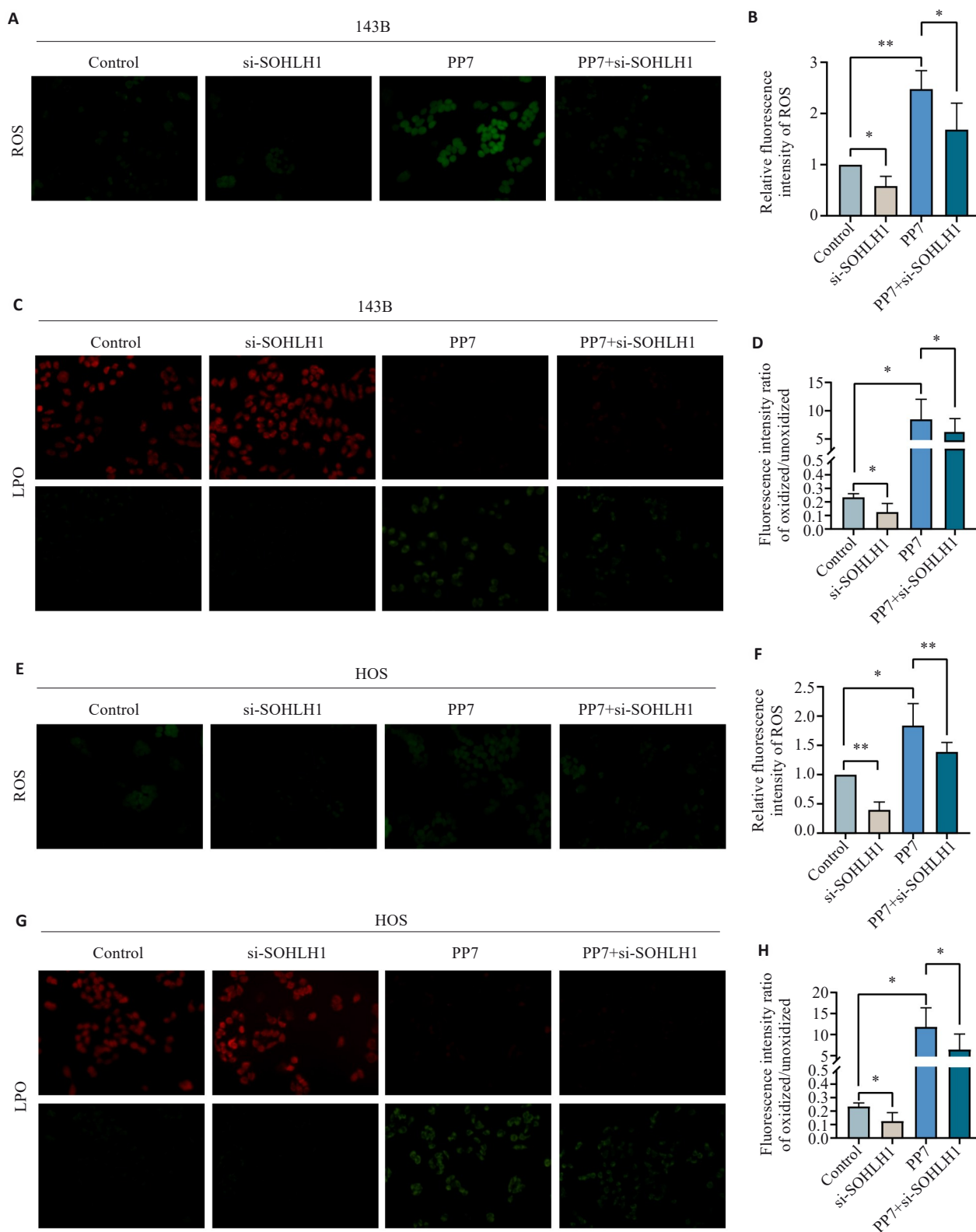


图7 PP7可能通过上调SOHLH1诱导骨肉瘤细胞铁死亡

Fig.7 PP7 induces ferroptosis in osteosarcoma cells possibly by upregulating SOHLH1. A-D: Effects of SOHLH1 knockdown, PP7 treatment and their combination on ROS (A, B) and LPO (C, D) levels in 143B cells. E-H: Effects of SOHLH1 knockdown, PP7 treatment and their combination on ROS (E, F) and LPO (G, H) levels in HOS cells (×200). \**P*<0.05, \*\**P*<0.01.

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

**参考文献:**

[1] Rojas GA, Hubbard AK, Diessner BJ, et al. International trends in incidence of osteosarcoma (1988-2012) [J]. *Int J Cancer*, 2021, 149

(5): 1044-53.

[2] Cui JC, Dean D, Hornicek FJ, et al. The role of extracellular matrix in osteosarcoma progression and metastasis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 178.

[3] Papakonstantinou E, Stamatopoulos A, Athanasiadis DI, et al. Limb-

- salvage surgery offers better five-year survival rate than amputation in patients with limb osteosarcoma treated with neoadjuvant chemotherapy. A systematic review and meta-analysis[J]. *J Bone Oncol*, 2020, 25: 100319.
- [4] Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029-35.
- [5] Zheng CX, Tang F, Min L, et al. PTEN in osteosarcoma: Recent advances and the therapeutic potential[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188405.
- [6] Lin SY, Zhou LN, Dong Y, et al. Alpha-(1, 6)-fucosyltransferase (FUT8) affects the survival strategy of osteosarcoma by remodeling TNF/NF- $\kappa$ B2 signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1124.
- [7] Lin ZJ, Xie XB, Lu SY, et al. Noncoding RNAs in osteosarcoma: Implications for drug resistance[J]. *Cancer Lett*, 2021, 504: 91-103.
- [8] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug[J]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925.
- [9] Zhang B, Zhang Y, Li RZ, et al. The efficacy and safety comparison of first-line chemotherapeutic agents (high-dose methotrexate, doxorubicin, cisplatin, and ifosfamide) for osteosarcoma: a network meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 51.
- [10] Liu YM, Yang SS, Wang KL, et al. Cellular senescence and cancer: Focusing on traditional Chinese medicine and natural products[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(10): e12894.
- [11] Wang S, Fu JL, Hao HF, et al. Metabolic reprogramming by traditional Chinese medicine and its role in effective cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105728.
- [12] Zhou N, Xu LF, Park SM, et al. Genetic diversity, chemical components, and property of biomass *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 713860.
- [13] Wang HQ, Xiao XJ, Li ZZ, et al. Polyphyllin VII, a novel moesin inhibitor, suppresses cell growth and overcomes bortezomib resistance in multiple myeloma[J]. *Cancer Lett*, 2022, 537: 215647.
- [14] Zhang C, Li QR, Qin GZ, et al. Anti-angiogenesis and anti-metastasis effects of Polyphyllin VII on Hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 41.
- [15] Cui JX, Man SL, Cui NN, et al. The synergistic anticancer effect of formosanin C and polyphyllin VII based on caspase-mediated cleavage of Beclin1 inhibiting autophagy and promoting apoptosis [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(1): e12520.
- [16] Hsieh MJ, Chien SY, Lin JT, et al. Polyphyllin G induces apoptosis and autophagy cell death in human oral cancer cells[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(13): 1545-54.
- [17] Li XD, Liu Y, Liao SJ, et al. Polyphyllin VII induces apoptosis and autophagy *via* mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels and the JNK pathway in human osteosarcoma U2OS cells[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(1): 180-90.
- [18] Liu Y, Feng WY, Dai Y, et al. Single-cell transcriptomics reveals the complexity of the tumor microenvironment of treatment-naive osteosarcoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 709210.
- [19] Hassan NM, Alhossary AA, Mu YG, et al. Protein-ligand blind docking using QuickVina-W with inter-process spatio-temporal integration[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15451.
- [20] Feng FF, Cheng P, Wang CC, et al. Polyphyllin I and VII potentiate the chemosensitivity of A549/DDP cells to cisplatin by enhancing apoptosis, reversing EMT and suppressing the CIP2A/AKT/mTOR signaling axis[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(5): 5428-36.
- [21] Pang DJ, Li C, Yang CC, et al. Polyphyllin VII promotes apoptosis and autophagic cell death *via* ROS-inhibited AKT activity, and sensitizes glioma cells to temozolomide[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1805635.
- [22] Li J, Jia JH, Zhu WW, et al. Therapeutic effects on cancer of the active ingredients in rhizoma paridis[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1095786.
- [23] Zhang Q, Chang S, Yang Y, et al. Endophyte-inoculated rhizomes of *Paris polyphylla* improve polyphyllin biosynthesis and yield: a transcriptomic analysis of the underlying mechanism[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1261140.
- [24] Xiang YC, Wan F, Ren YL, et al. Polyphyllin VII induces autophagy-dependent ferroptosis in human gastric cancer through targeting T-lymphokine-activated killer cell-originated protein kinase[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(12): 5803-20.
- [25] Wu YZ, Yang L, Li ZZ, et al. Polyphyllin VII enhances the antitumor activity of cisplatin in non-small cell lung cancer cells by inducing ferroptosis and enhancing apoptosis[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2025, 39(4): e70186.
- [26] Liu YH, Wu WT, Cai CJ, et al. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 160.
- [27] Abdolahi S, Ghazvinian Z, Muhammadnejad S, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 206.
- [28] Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, et al. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(21): 8090-5.
- [29] Matson CK, Murphy MW, Griswold MD, et al. The mammalian doublesex homolog *DMRT1* is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(4): 612-24.
- [30] Liu XY, Gao Q, Zhao N, et al. *Sohlh1* suppresses glioblastoma cell proliferation, migration, and invasion by inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(4): 494-502.
- [31] Dixon SJ. Ferroptosis: bug or feature? [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1): 150-7.
- [32] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.
- [33] Kwun MS, Lee DG. Ferroptosis-like death in microorganisms: a novel programmed cell death following lipid peroxidation [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2023, 33(8): 992-7.
- [34] Mou YH, Wang J, Wu JC, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [35] Wang Y, Zhou XR, Yao L, et al. Capsaicin enhanced the efficacy of photodynamic therapy against osteosarcoma *via* a pro-death strategy by inducing ferroptosis and alleviating hypoxia [J]. *Small*, 2024, 20(26): e2306916.
- [36] Wen RJ, Dong X, Zhuang HW, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154881.