

伊利司莫 - 铜离子诱导肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 发生铜死亡

任俏慧, 朱欣悦, 吕伟, 臧艳, 王莲子, 周心怡, 姚骏骁, 李涛

(安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230032)

摘要 目的 研究伊利司莫 - 铜离子(ES + Cu²⁺)对人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的增殖抑制作用及其诱导铜死亡的潜力。方法 体外培养人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞, 分别施以 ES 溶液、Cu²⁺ 溶液和铜螯合剂四硫代钼酸铵(ATTM)溶液的单独或联合处理。采用 CCK-8 试剂盒评估 ES + Cu²⁺ 对人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞存活率的影响, 以及铜螯合剂 ATTM 预处理后 ES + Cu²⁺ 对细胞存活率的作用。流式细胞术检测 ES + Cu²⁺ 诱导的细胞死亡情况及经铜螯合剂 ATTM 预处理后 ES + Cu²⁺ 诱导细胞死亡的变化。Western blot 检测 ES + Cu²⁺ 诱导后细胞铜死亡相关蛋白 ATP 酶铜转运 β(ATP7B)、铁氧还蛋白 1(FDX1)、二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶(DLAT)、超氧化物歧化酶 1(SOD1) 的表达情况及经铜螯合剂 ATTM 预处理后 ES + Cu²⁺ 对铜死亡相关蛋白表达的影响。细胞划痕实验检测 ES + Cu²⁺ 对细胞增殖能力的影响及 ATTM 预处理后的逆转效应。结果 ES + Cu²⁺ 对人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的毒性呈现显著的剂量依赖性($P < 0.05$)。ES 和 Cu²⁺ 联合应用相较于单独使用 ES 或者 Cu²⁺ 对肝癌细胞的抑制效果更为显著($P < 0.05$), 而铜螯合剂 ATTM 能够逆转 ES + Cu²⁺ 对细胞增殖的抑制效应($P < 0.05$)。流式结果显示, 与对照组相比, ES + Cu²⁺ 处理后加重人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的细胞毒活性, 而 ATTM 干预后较 ES + Cu²⁺ 处理组细胞的毒活性减轻($P < 0.05$)。细胞划痕实验结果表明, ES + Cu²⁺ 处理后 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞的迁移能力降低, 而 ATTM 的加入逆转了 ES + Cu²⁺ 对细胞迁移的抑制作用($P < 0.05$)。与对照组相比, ES + Cu²⁺ 处理后铜死亡相关蛋白 ATP7B、FDX1、DLAT 和 SOD1 的表达水平均有所下降, 而 ATTM 的加入逆转了这些蛋白表达的变化趋势($P < 0.05$)。结论 ES 与 Cu²⁺ 的联合应用能够有效抑制肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的增殖和迁移能力, 并诱导铜死亡, 为肝细胞癌的治疗提供了新的策略。

关键词 伊利司莫 - 铜离子; 肝细胞癌; 铜死亡; 增殖; 迁移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2025)08 - 1470 - 08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.08.015

肝细胞癌是常见的原发性肝癌类型, 病死率在我国癌症致死原因中位列第三。然而, 大多数患者在确诊时已处于疾病的中晚期阶段, 手术治疗往往无法实现根治, 且预后较差^[1]。因此, 开发新的治疗策略和药物应对中晚期肝癌的治疗需求显得尤为迫切。

铜死亡是由细胞内铜离子过量累积导致的细胞死亡方式^[2]。当人体内的铜过量时, 可以诱导细胞

死亡^[3]。伊利司莫(Elesclomol, ES)是一种治疗实体瘤的线粒体靶向药物^[4], 用于治疗门克氏综合征的小鼠^[5]。研究^[6]显示, ES 能够将铜离子转运至细胞内。人类肿瘤组织中的铜浓度高于正常组织^[7], 而肿瘤组织中的铜累积程度并不能促使肿瘤组织发生铜死亡。因此该研究将 ES 与 Cu²⁺ 联合应用于人肝癌细胞系, 初步探讨了其对人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞活性的抑制作用, 旨在为新药开发提供实验依据, 为肝癌细胞成功诱导铜死亡提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系及主要试剂 人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 购自广州赛库生物技术有限公司。DMEM 和 MEM 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 青链霉素混合液(100 ×)、5 × loding buffer、

2025 - 04 - 10 接收

基金项目: 安徽医科大学“抗炎免疫药物教育部重点实验室”开放研究基金重点项目(编号: KFJJ-2021-04); 安徽省学术和技术带头人及后备人选科研活动经费资助项目(编号: 2022H291); 安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号: 2023zhyx-C24); 安徽医科大学横向课题经费资助项目(编号: 2023009)

作者简介: 任俏慧, 女, 硕士研究生;

李涛, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: limedical1974@126.com

CCK-8 试剂和 ECL 化学发光底物(超敏)购自安徽白鲨生物技术有限公司;胎牛血清购自南京维森特生物技术公司;胰酶细胞消化液(0.25%)、RIPA 裂解液(强)和 PMSF 溶液购自上海碧云天生物技术公司;二甲基亚砜 DMSO 购自北京索莱宝科技有限公司;ES、特异性铜螯合剂四硫代钼酸铵(ammonium tetrathiomolybdate, ATTM)购自上海 MedChemExpress(MCE)公司;Cu²⁺粉末购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;7-AAD 细胞活力染色液(40745ES64)购自上海翌圣生物科技股份有限公司;通用型抗体稀释液(PS119)、PAGE 凝胶快速制备试剂盒和双色预染蛋白 Marker(WJ101)购自上海雅酶生物医药科技有限公司;ATP7B 抗体(TA0410)、SOD1 抗体(T56666)购自上海艾比玛特(Abmart)医药科技有限公司;FDX1(12592-1-AP)、GAPDH(60004-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;DLAT(PA5-59298)购自美国赛默飞(Thermo)有限公司;PVDF 膜(IPYH00010)购自美国 Millipore 有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备 多功能酶标仪(型号:EPS-300)购自美国赛默飞(Thermo)有限公司;倒置显微镜(型号:IX73)购自日本奥林巴斯有限公司;流式细胞仪(型号:DxFlex)购自上海贝克曼库尔特国际贸易有限公司;电泳仪(型号:EPS-300)购自上海天能生命科学有限公司;化学发光成像仪(型号:ChemiDoc XRS⁺)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 体外培养 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞系,培养基分别为 MEM 完全培养基和 DMEM 完全培养基(MEM 基础培养基 + 10% 新生胎牛血清 + 1% 双抗;DMEM 基础培养基 + 10% 新生胎牛血清 + 1% 双抗),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞培养密度达到 80% 后用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞。待消化完成后,弃去胰酶,用 PBS 冲洗细胞,800 r/min 离心 5 min,收集细胞。向收集的细胞中加入完全培养基进行传代。实验将细胞分为对照组、ES 组、Cu²⁺ 组、ES + Cu²⁺ 组以及 ES + Cu²⁺ + ATTM 组。

1.2.2 CCK-8 法检测 ES + Cu²⁺ 对细胞活性的影响

收集细胞状态生长较好且处于对数生长期的 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞。将细胞计数后,以 8 × 10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板,每孔体积为 100 μL,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁且密度达到 70% 左右时对细胞进行处理。对

照组不添加任何药物;空白对照组加入等体积的 MEM 完全培养基或者 DMEM 完全培养基;ES 组按照 0、40、80、160、320、640、1 280 nmol/L 的浓度梯度处理细胞;Cu²⁺ 组按照 1、2、3、4 μmol/L 的浓度梯度处理细胞;ES + Cu²⁺ 组则将 ES 组和 Cu²⁺ 联合作用加入细胞。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后弃掉培养基,使用 CCK-8 检测试剂盒,在 96 孔板的各个孔中加入含有 10% 的 CCK-8 试剂溶液的无血清培养基 100 μL,37℃、5% CO₂ 孵箱中避光孵育 2 h。最后利用多功能酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔的吸光度(optical density, OD)值,计算细胞存活率。细胞存活率 = (OD 处理组 - OD 空白组) / (OD 对照组 - OD 空白组) × 100%;细胞抑制率 = 1 - 细胞存活率。

1.2.3 流式细胞术实验检测细胞活力 收集细胞状态较好且处于对数生长期的 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞,计数后按照 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,每孔体积为 2 mL,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁且密度达到 70% 左右时对细胞进行处理。设置对照组、ES + Cu²⁺ 和 ES + Cu²⁺ + ATTM 组,分别培养 24 h。使用胰酶消化细胞后,将上清液和细胞沉淀收集至流式管中,800 r/min 离心 5 min,弃去上清液,然后向管中加入 10 μL 7-AAD 染料和 200 μL PBS 溶液,进行流式细胞术检测。

1.2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将细胞以每孔 5 × 10⁵ 个的密度接种于 6 孔板,每孔体积为 2 mL。置于 37℃、5% CO₂ 孵箱培养,待细胞贴壁密度达到 90% 后,用 200 μL 无菌枪头尖端在细胞单层上划出一道划痕。接着用 PBS 缓冲液轻轻清洗 2 ~ 3 次,以去除划痕过程中产生的细胞碎片。然后根据实验设计,向孔板中分别加入对照组、ES + Cu²⁺ 组和 ES + Cu²⁺ + ATTM 组的药物,分别在 0、24 h,使用显微镜拍摄细胞划痕区域的图像。最后用 ImageJ 软件分析划痕的愈合情况,并将结果与对照组进行比较,以评估不同处理对细胞迁移能力的影响。

1.2.5 蛋白质印迹法检测铜死亡相关蛋白的表达

收集细胞状态较好且处于对数生长期的 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞,计数后按照 4 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,每孔体积为 2 mL,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁且密度达到 80% 左右时按照对照组、ES + Cu²⁺ 组和 ES + Cu²⁺ + ATTM 组加入相应的药物培养 24 h。24 h 后弃去培养基上清液,用 PBS 溶液清洗 2 ~ 3 次,再加入 1 mL PBS 溶

液并用细胞刮刀刮取细胞。收集上清液和细胞沉淀后,以 800 r/min 离心 5 min,弃去上清液,向沉淀中加入 100 μL RIPA 裂解液和 1 μL 蛋白酶抑制剂,对细胞进行超声处理,离心收集总蛋白。使用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行定量测定,制成 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蛋白样品,用于 SDS-PAGE 电泳分析。电泳完成后将蛋白转移至 PVDF 膜上,整个转膜过程将膜置于冰水浴中。转膜完成后,使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。封闭完后用 TBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min。牛奶洗净后将免疫印迹膜置于一抗中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中摇床作用过夜。TBST 缓冲液清洗 6 次,每次 5 min,用相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温摇床作用 1 h。TBST 缓冲液清洗,最后用 Bio-Rad 凝胶成像仪进行曝光。

1.3 统计学处理 利用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析,每组实验的重复次数不少于 3 次。所有定量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式展示。两组间的数据比较分析采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ES + Cu²⁺ 抑制肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的增殖能力 CCK-8 实验显示,分别用浓度为 40、80、160、320、640、1 280 nmol/L 的 ES 和浓度为 1、2、3、4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Cu²⁺ 作用肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞 24 h 后,与对照组相比,ES 单独作用于肝癌细胞或者 Cu²⁺ 单独作用于肝癌细胞时,两者对肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的增殖能力几乎没有影响,见图 1A、B。将 ES 和 Cu²⁺ 联合使用共同孵育 24 h 后,显示 ES + Cu²⁺ 对人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的毒性呈现显著的剂量依赖性($P < 0.05$),且 Cu²⁺ 为 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时对细胞增殖抑制效果更明显,见图 1C、D。根据 IC₅₀ 值,后续实验使用 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Cu²⁺ 溶液和 80 nmol/L ES 溶液共同作用 PLC/PRF/5 细胞,使用 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Cu²⁺ 溶液和 40 nmol/L ES 溶液共同作用 Huh-7 细胞。共同孵育 24 h 之后,与对照组 (NC) 相比,肝癌细胞 PLC/PRF/5 的增殖能力下降 ($t = 12.44, P < 0.001$), Huh-7 细胞的增殖能力下降 ($t = 19.91, P < 0.0001$),见图 1E。在此基础上,加入铜螯合剂 ATTM 后,PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞的增殖能力明显增加 ($t = 13.08、25.92, P < 0.001、P < 0.0001$),见图 1F。结果表明,ES 和 Cu²⁺ 联合应用能够抑制肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的增殖能力,而铜螯

合剂 ATTM 能够逆转 ES 与 Cu²⁺ 联合抑制肝癌细胞增殖的效果。因此在后续的实验中,将 ES 和 Cu²⁺ 联合应用作用于肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7。

2.2 ES + Cu²⁺ 联合使用促进肝癌 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞的死亡 流式细胞术的分析结果表明,相较于对照组,ES 和 Cu²⁺ 联合处理显著提高了肝癌细胞的死亡率 ($t = 113.2、47.87, 均 P < 0.0001$)。然而,在加入 ATTM 的实验组中,细胞死亡率相较于仅使用 ES + Cu²⁺ 的组别有所下降 ($t = 35.38、22.98, 均 P < 0.0001$),见图 2。这表明 ES 和 Cu²⁺ 的联合应用能够增强肝癌细胞的死亡效应,而 ATTM 则能够部分抑制 ES + Cu²⁺ 对肝癌细胞的致死作用。

2.3 ES + Cu²⁺ 联合使用抑制肝癌 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞的迁移能力 细胞划痕实验结果表明,在肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 中,相较于对照组,ES + Cu²⁺ 组的愈合速率显著降低 ($t = 15.42、13.69, 均 P < 0.001$),而 ES + Cu²⁺ + ATTM 组的愈合速率虽低于对照组,但高于 ES + Cu²⁺ 组 ($t = 16.20、8.78, P < 0.0001、P < 0.001$),见图 3。此结果揭示了 ES 与 Cu²⁺ 的联合应用对肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的迁移能力具有抑制作用,且 ATTM 能够逆转 ES + Cu²⁺ 对肝癌细胞迁移能力的抑制效应。

2.4 ES + Cu²⁺ 联合使用对肝癌 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞内铜死亡相关蛋白表达的影响 在经过 ES + Cu²⁺ 和 ES + Cu²⁺ + ATTM 处理的细胞中,Western blot 结果显示,在 ES + Cu²⁺ 处理条件下,与对照组相比,肝癌细胞中调控铜死亡的关键线粒体蛋白 FDX1 的表达量降低 ($t = 6.394、6.157, P < 0.01$),同时参与铜稳态调节的蛋白 ATP7B 的表达量亦有所减少 ($t = 5.54、24.3, P < 0.01$)。此外,与硫辛酰化相关的蛋白 DLAT ($t = 5.48、11.86, P < 0.01、P < 0.001$) 以及抗氧化蛋白 SOD1 ($t = 4.78、4.84, P < 0.01$) 的表达量同样表现出下降趋势。当肝癌细胞接受 ES + Cu²⁺ + ATTM 处理后,与 ES + Cu²⁺ 相比,线粒体蛋白 FDX1 表达升高 ($t = 2.886、3.054, P < 0.05$),铜稳态调节蛋白 ATP7B 表达升高 ($t = 4.25、9.22, P < 0.05$),且硫辛酰化蛋白 DLAT ($t = 3.904、5.459, P < 0.05、P < 0.01$) 和抗氧化蛋白 SOD1 ($t = 2.785、3.573, P < 0.05$) 蛋白均有升高,见图 4。这一实验结果揭示了 ES + Cu²⁺ 能够促进肝癌 PLC/PRF/5 和 Huh-7 细胞的铜死亡进程,而 ATTM 则能够有效逆转由 ES + Cu²⁺ 诱导的肝癌细

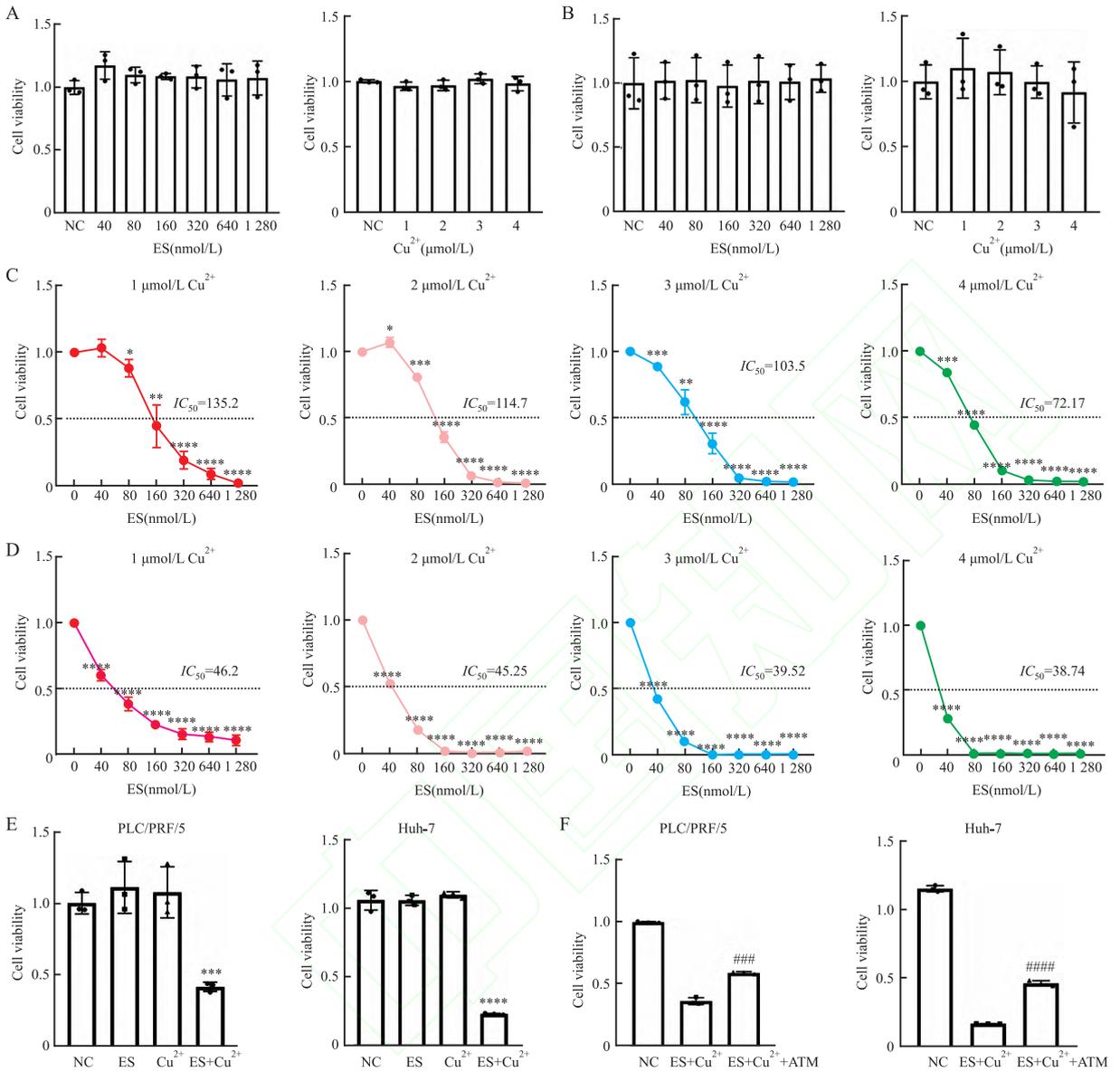


图1 ES和Cu²⁺对肝癌细胞系PLC/PRF/5和Huh-7增殖能力的影响

Fig. 1 The effects of ES and Cu²⁺ on proliferation of PLC/PRF/5 and Huh-7 hepatoma cell lines

A: The effects of ES and Cu²⁺ alone on proliferation of PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cells; B: The effects of ES and Cu²⁺ alone on proliferation of Huh-7 hepatocellular carcinoma cells; C: The effects of ES and Cu²⁺ on proliferation of PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cells 24 hours post treatment; D: The effects of ES and Cu²⁺ on proliferation of Huh-7 hepatocellular carcinoma cells for 24 hours; E: The effects of combined use of ES and Cu²⁺ on the proliferation of PLC/PRF/5 and Huh-7 hepatoma cells; F: The effects of ATM intervention on the proliferation of PLC/PRF/5 and Huh-7 in hepatocellular carcinoma cells after combined use of ES and Cu²⁺; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs NC group; ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs ES + Cu²⁺ group.

胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 的铜死亡。

3 讨论

肝癌作为临床中常见的实体恶性肿瘤,手术切除目前被认为是效果最为显著的方案。尽管化疗和靶向治疗对于全身转移的肝癌患者也具有一定的疗效,但其副作用及潜在的耐药性问题,使得治疗效果

受限,增加了治疗肝癌的难度^[8]。因此,开发新的治疗方法和化疗药物以改善肝癌患者的不良预后和提高长期生存率,已成为亟待解决的临床问题。

近期,铜死亡现象引起了广泛的关注。FDX1是铜死亡的关键蛋白,能够诱导线粒体发生脂酰化,对调节三羧酸循环具有关键的作用^[9]。而FDX1在铜死亡中的关键性的作用尚需进一步研究。硫辛酰

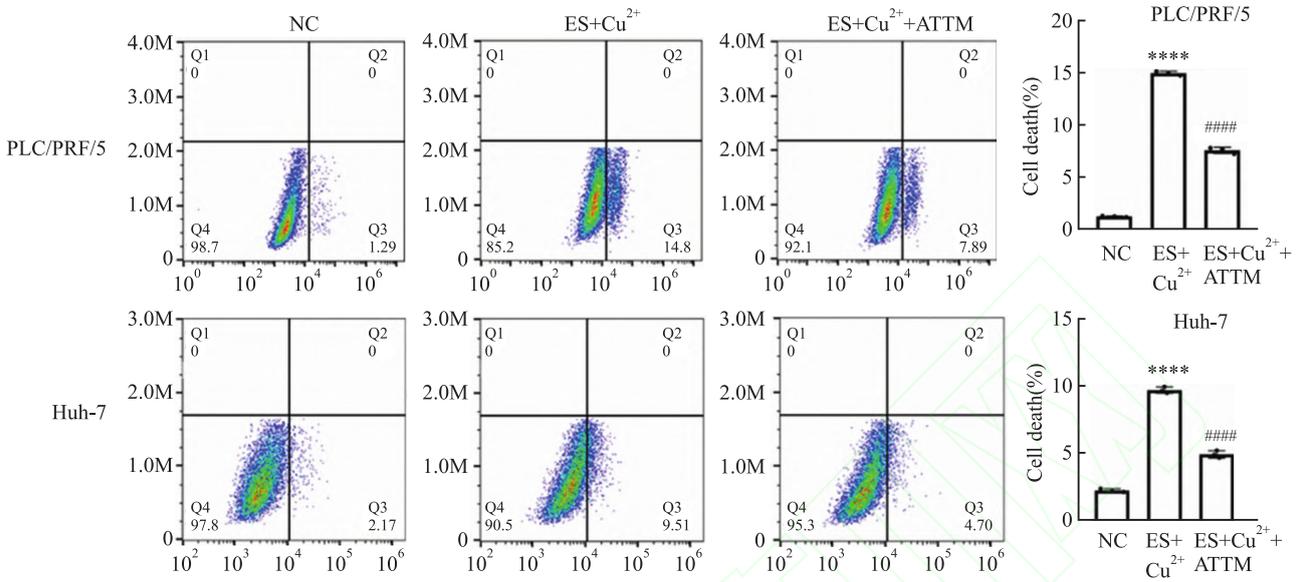


图2 ES和Cu²⁺联合使用对肝癌细胞系PLC/PRF/5和Huh-7细胞毒活性的影响

Fig. 2 The effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on cytotoxic activity of PLC/PRF/5 and Huh-7 hepatoma cell lines

*** P < 0.0001 vs NC group; #### P < 0.0001 vs ES + Cu²⁺ group.

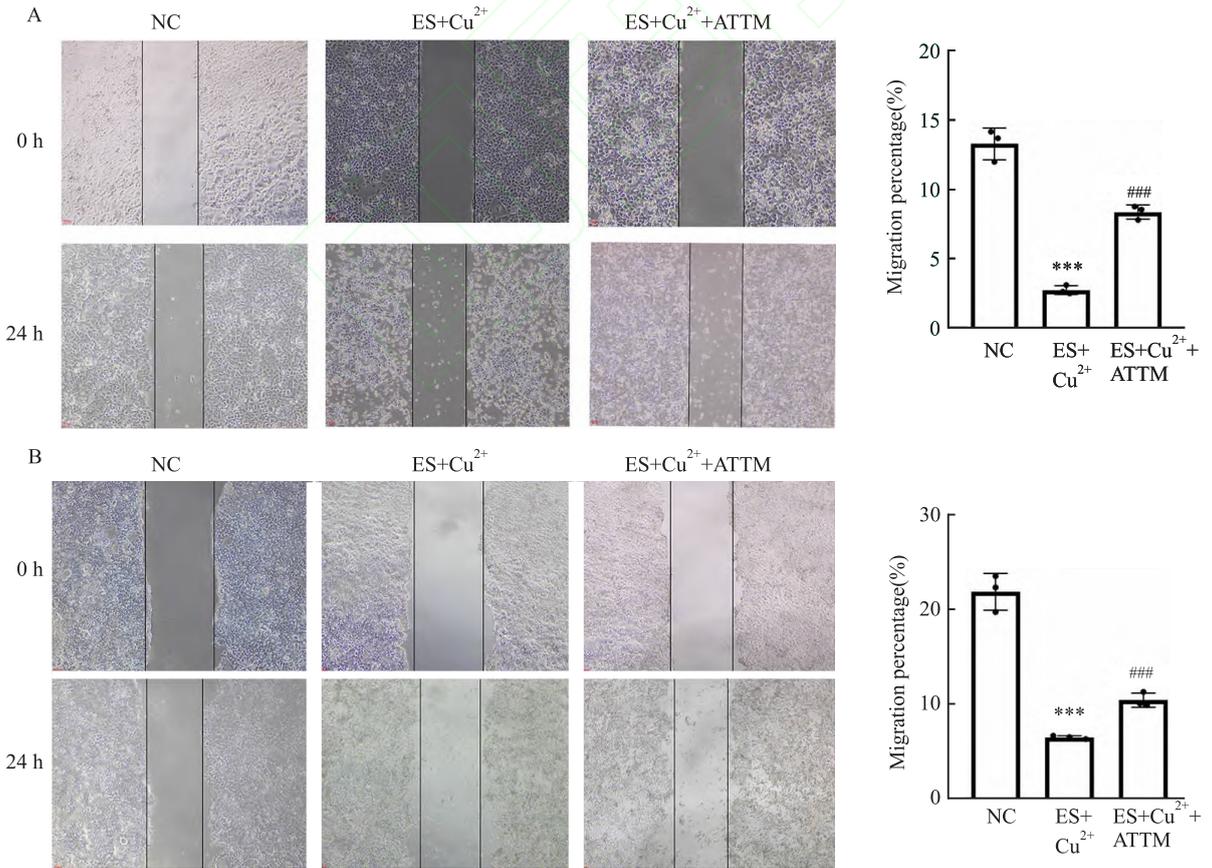


图3 ES和Cu²⁺联合使用对肝癌细胞系PLC/PRF/5和Huh-7迁移能力的影响 ×10

Fig. 3 Effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on the migration capacity of PLC/PRF/5 and Huh-7 hepatoma cell lines ×10

A: The effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on the migration capacity of PLC/PRF/5 hepatoma cell lines; B: The effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on the migration capacity of Huh-7 hepatoma cell lines; *** P < 0.001 vs NC group; #### P < 0.001 vs ES + Cu²⁺ group.

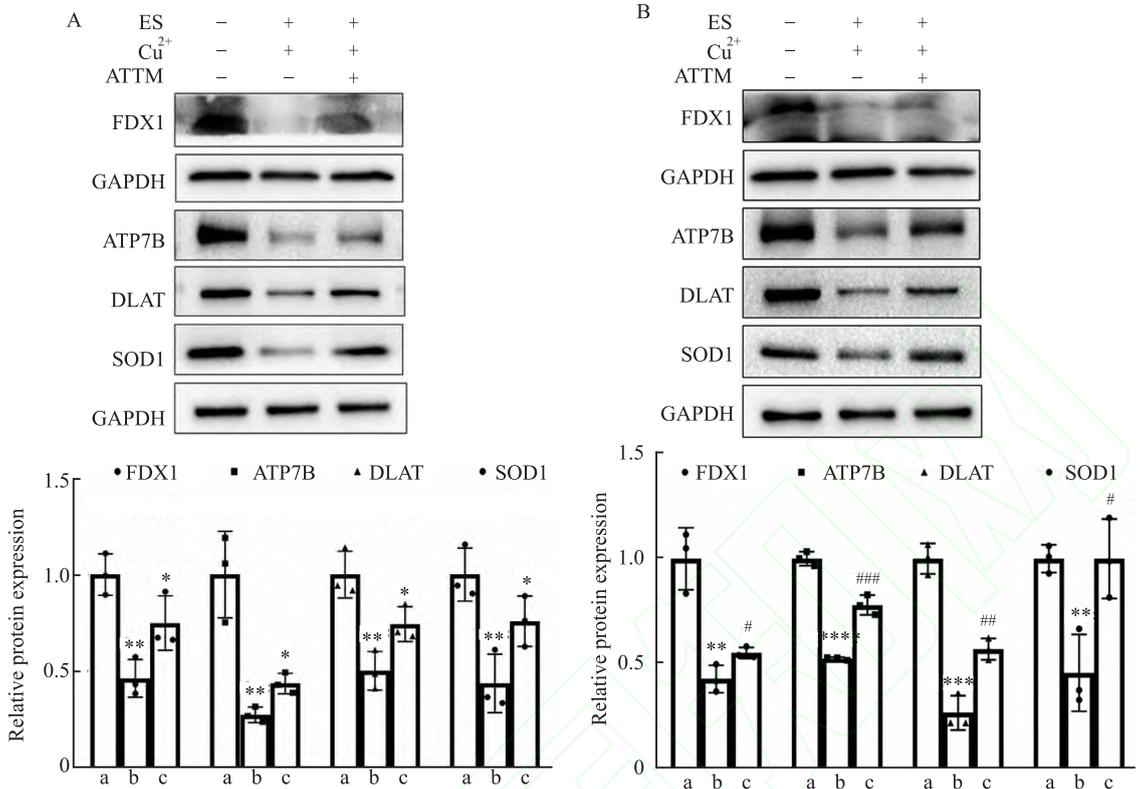


图 4 ES 和 Cu²⁺ 联合作用肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 对铜死亡相关蛋白表达的影响

Fig. 4 The effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on the expression of Cuproptosis-related proteins in PLC/PRF/5 and Huh-7 hepatocellular carcinoma cell lines

A: The effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on the expression of Cuproptosis-related proteins in PLC/PRF/5 hepatocellular carcinoma cell lines; B: The effects of combined administration of ES and Cu²⁺ on the expression of Cuproptosis-related proteins in Huh-7 hepatocellular carcinoma cell lines; a:NC;b:ES + Cu²⁺; c:ES + Cu²⁺ + ATTM; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001 vs NC group; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs ES + Cu²⁺ group.

化蛋白 DLAT 是丙酮酸脱氢酶复合体中的一个重要酶,参与能量代谢和氧化还原反应。研究^[10]表明 DLAT 在肿瘤的发生发展中可能发挥重要作用,为细胞提供能量。因而 DLAT 在肝癌细胞发生铜死亡过程中扮演了重要的角色。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是一类重要的抗氧化酶,能催化超氧阴离子(O²⁻)的歧化反应,将其转化为 H₂O₂ 和 O₂,在细胞内的氧化还原平衡和抗氧化防御中发挥重要作用^[11]。SOD1 是 SOD 的一种同工酶,通过减轻氧化应激,保护细胞免受氧化损伤,有助于减轻线粒体中由活性氧造成的潜在损害^[12]。铜稳态蛋白 ATP7B 是一个编码铜转运 ATP 酶的基因,它在维持铜稳态方面起着至关重要的作用,铜稳态是各种生物过程正常运作所必需的^[13],因此对 ATP7B 的研究有助于深入理解铜死亡。已有研究^[2,14]表明,肿瘤组织中的铜浓度高于正常组织,但尚未达到诱发铜死亡的水平。因此,Cu²⁺ 载体在诱

导肿瘤组织铜死亡方面发挥了关键作用,这也使得 ES 成为研究的焦点。ES 可以特异性地与 Cu²⁺ 结合,导致细胞内的 Cu²⁺ 大量积累,引发严重的氧化应激反应^[15]。ES 和 Cu²⁺ 联合应用能够降低线粒体复合物 I 和 III 的活性,损伤成肌细胞,同时提高铜稳态蛋白 CTR1 的表达,导致细胞内的 Cu²⁺ 浓度升高,当 Cu²⁺ 积累到一定程度时,将引发蛋白质毒性应激,导致细胞死亡^[16]。因而,ES 有助于维持细胞内 Cu²⁺ 平衡,促进 Cu²⁺ 的吸收和运输,对于预防和治疗细胞内铜过量引起的疾病具有潜在价值。

本研究主要探讨了 ES 与 Cu²⁺ 对肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh-7 增殖能力的影响。本研究中,联合使用 ES 和 Cu²⁺ 能够抑制肝癌细胞的增殖和迁移,促进死亡。同时探究了铜死亡相关蛋白的表达情况,结果表明 Cu²⁺ 与 ES 可能通过影响线粒体功能和氧化应激反应来诱导肝癌细胞的铜死亡。在联合使用 ES 和 Cu²⁺ 的基础上加入铜螯合剂 ATTM,观察到肝癌细胞的增殖和迁移能力有所恢复,细胞

死亡数减少,且铜死亡相关蛋白的表达量呈上升趋势。

综上所述,本研究首次证明了 ES 与 Cu^{2+} 联合使用在诱导肝癌细胞 PLC/PRF/5 和 Huh-7 铜死亡方面的有效性。为开发新的抗肝癌药物提供了重要的理论基础,并为临床治疗肝癌提供了新的思路。未来的研究将着重于深入探讨铜死亡在肝癌中的具体分子机制,并评估其在动物模型中的抗肿瘤效果,以期早日将这一新的治疗策略应用于临床。

参考文献

- [1] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 中国肿瘤整合诊治指南(CACA)-肝癌部分[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(3): 31-63. doi:10.12151/JMCM.2022.03-06.
The Society of Liver Cancer, Association C A. CACA guidelines for holistic integrative management of cancer-liver cancerpart[J]. J Multidiscip Cancer Manag Electron Version, 2022, 8(3): 31-63. doi:10.12151/JMCM.2022.03-06.
- [2] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-61. doi:10.1126/science.abf0529.
- [3] Chen L, Min J, Wang F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 378. doi:10.1038/s41392-022-01229-y.
- [4] Tarin M, Babaie M, Eshghi H, et al. Elesclomol, a copper-transporting therapeutic agent targeting mitochondria: from discovery to its novel applications[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 745. doi:10.1186/s12967-023-04533-5.
- [5] Guthrie L M, Soma S, Yuan S, et al. Elesclomol alleviates Menkes pathology and mortality by escorting Cu to cuproenzymes in mice[J]. *Science*, 2020, 368(6491): 620-5. doi:10.1126/science.aaz8899.
- [6] 岳 恺, 方 艳, 王旭东. 铜死亡在肿瘤中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2023, 50(16): 844-9. doi:10.12354/j.issn.1000-8179.2023.20230539.
Yue K, Fang Y, Wang X D. Research progress on cuproptosis in human cancers[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2023, 50(16): 844-9. doi:10.12354/j.issn.1000-8179.2023.20230539.

- [7] Lossow K, Schwarz M, Kipp A P. Are trace element concentrations suitable biomarkers for the diagnosis of cancer? [J]. *Redox Biol*, 2021, 42: 101900. doi:10.1016/j.redox.2021.101900.
- [8] Llovet J M, De Baere T, Kulik L, et al. Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(5): 293-313. doi:10.1038/s41575-020-00395-0.
- [9] Mohibi S, Zhang Y, Perng V, et al. Ferredoxin 1 is essential for embryonic development and lipid homeostasis[J]. *eLife*, 2024, 13: e91656. doi:10.7554/eLife.91656.
- [10] Woolbright B L, Rajendran G, Harris R A, et al. Metabolic flexibility in cancer: targeting the pyruvate dehydrogenase kinase: pyruvate dehydrogenase axis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(10): 1673-81. doi:10.1158/1535-7163.MCT-19-0079.
- [11] 刘 鑫, 丁士刚. 超氧化物歧化酶与胃癌的关系[J]. *胃肠病学*, 2015, 20(5): 308-10. doi:10.3969/j.issn.1008-7125.2015.05.012.
Liu X, Ding S G. Relationship between superoxide dismutase and gastric cancer[J]. *Chin J Gastroenterol*, 2015, 20(5): 308-10. doi:10.3969/j.issn.1008-7125.2015.05.012.
- [12] Luo M, Shen N, Shang L, et al. Simultaneous targeting of NQO1 and SOD1 eradicates breast cancer stem cells via mitochondrial futile redox cycling[J]. *Cancer Res*, 2024, 84(24): 4264-82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-24-0800.
- [13] Dong J, Xiang G, Xia X, et al. Aberrant copper metabolism and hepatic inflammation cause neurological manifestations in a mouse model of Wilson's disease[J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 235. doi:10.1186/s12974-024-03178-5.
- [14] Ge E J, Bush A I, Casini A, et al. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22(2): 102-13. doi:10.1038/s41568-021-00417-2
- [15] Nagai M, Vo N H, Shin Ogawa L, et al. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(10): 2142-50. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.017.
- [16] Fu D G, He J Z, Mu Q C, et al. Inhibition of CTR1 expression improves hypoxia/reoxygenation-induced myoblast injury by blocking cuproptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 735: 150804. doi:10.1016/j.bbrc.2024.150804.

Elesclomol combined with Cu^{2+} induced cuproptosis in hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh-7

Ren Qiaohui, Zhu Xinyue, Lü Wei, Zang Yan, Wang Lianzi, Zhou Xinyi, Yao Junxiao, Li Tao
(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of Elesclomol (ES) + Cu^{2+} on the proliferation of human hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh-7 and its potential to induce Cuproptosis. **Methods** Human hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh-7 cells were cultured *in vitro*. ES solution, Cu^{2+} solution and copper chelating agent ammonium tetrathiomolybdate VI (ATTM) solution was treated separately or in combination. The effect of ES + Cu^{2+} on the survival rate of human hepatoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh-7 cells and the effect of ES + Cu^{2+} on the survival rate after pretreatment with copper chelating agent ATTM were evaluated using CCK-8 kit. The cell

death induced by ES + Cu²⁺ was detected by flow cytometry and the changes of ES + Cu²⁺ after pretreatment with copper chelating agent ATTM. The expression of Cuproptosis related proteins ATPase copper transporting beta (ATP7B), ferredoxin 1 (FDX1), dihydrolipoamide s-acetyltransferase (DLAT) and superoxide dismutase 1 (SOD1) were detected by Western blot. The effect of ES + Cu²⁺ on cell proliferation and the reverse effect after ATTM pretreatment was detected by cell scratch assay. **Results** The toxicity of ES + Cu²⁺ to human hepatocellular carcinoma cell lines PLC/PRF/5 and Huh-7 was significantly dose-dependent ($P < 0.05$). Compared with the control group, the combined application of ES and Cu²⁺ had a more significant inhibitory effect on hepatocellular carcinoma cells than ES or Cu²⁺ alone ($P < 0.05$), and copper chelating agent ATTM could reverse the inhibitory effect of ES + Cu²⁺ on hepatocellular carcinoma cells ($P < 0.05$). Flow cytometry results showed that compared with the control group, the proportion of cell death in PLC/PRF/5 and Huh-7 cells treated with ES + Cu²⁺ increased, while the proportion of cell death decreased after ATTM intervention ($P < 0.05$). The results of cell scratch test showed that the migration ability of PLC/PRF/5 and Huh-7 cells was decreased after ES + Cu²⁺ treatment, however, the addition of ATTM reversed the inhibitory effect of ES + Cu²⁺ on cell migration ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of copper death related proteins ATP7B, FDX1, DLAT and SOD1 decreased after ES + Cu²⁺ treatment, but the addition of ATTM reversed the expression trend of these proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of ES and Cu²⁺ can effectively inhibit the proliferation and migration of PLC/PRF/5 and Huh-7 of hepatocellular carcinoma cells, and induce Cuproptosis, which provides a new strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma.

Key words Elesclomol-copper ion; hepatocellular carcinoma; cuproptosis; proliferation; migration

Fund programs Open Project of Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, at Anhui Medical University (No. KFJJ-2021-04); Anhui Provincial Academic and Technical Leaders and Reserve Candidates Project (No. 2022H291); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2023zhyx-C24); Commercial Research Funds, Anhui Medical University (No. 2023009).

Corresponding author Li Tao, E-mail: lomedical1974@126.com

(上接第 1469 页)

intervention at 100 mg/kg and 200 mg/kg effectively reversed these changes, lowering MDA and NOX4 levels ($t = 3.35, 4.30, P < 0.05$; $t = 5.44, 7.44, P < 0.01$), while restoring SOD ($t_{200 \text{ mg/kg}} = 4.04, P < 0.05$) and GSH ($t = 4.70, P < 0.05$; $t = 5.50, P < 0.01$). Endoplasmic reticulum stress markers, including GRP94、GRP78、p-eIF2 α 、CHOP ($t = 3.31, 6.53, 5.18, 3.09; P < 0.05, 0.01, 0.01, 0.05$), were significantly upregulated in the DEX group compared to the normal group. However, TGP treatment at 100 mg/kg and 200 mg/kg dose-dependently suppressed the expression of GRP94、GRP78、p-eIF2 α 、CHOP ($t = 3.14, 4.95, 3.13, 4.25, P < 0.05; t = 4.03, 7.48, 4.68, 5.10, P < 0.01$) expression levels were significantly reduced compared to the DEX group, and there was no significant change in the TGP (50 mg/kg) treatment group. **Conclusion** TGP exerts protective effects against DEX-induced liver injury, and its mechanism is likely mediated by suppressing hepatic oxidative stress and endoplasmic reticulum stress triggered by DEX in rats.

Key words total glycosides of paeony; glucocorticoid; dexamethasone; liver injury; oxidative stress; endoplasmic reticulum stress

Fund programs Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 2023s07020003); Special Cultivation Project for the Basic and Clinical Collaborative Research Enhancement Project of the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. 2022sfy016)

Corresponding authors Wang Chun, E-mail: wangchun@ahmu.edu.cn; Xu Bingfa, E-mail: zcandxbf@163.com