论著·基础医学

奥沙利铂通过诱导胃癌细胞铜死亡抑制胃癌

饶 航[1*],杨 虹[2*],熊梦源[1],张丽泳[1],韩 笑[2],邓博少[2],王露露[2],陈 戬[2],石 彦[1] 陆军军医大学(第三军医大学):[1]第一附属医院(西南医院)普通外科,[2]基础医学院免疫学教研室,重庆

[摘要] **目的** 探索奥沙利铂(oxaliplatin,OXA)治疗胃癌(gastric cancer,GC)时诱导细胞铜死亡(Cuproptosis)能力及潜在机制。**方法** 使用UALCAN数据库及Kaplan-Meier绘图仪工具分析铜死亡核心调控蛋白二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase,DLAT)、铁氧还蛋白1(Ferredoxin 1,FDX1)、硫辛酸合成酶(lipoic acid synthase,LIAS)在胃癌中的表达及预后意义;CCK-8检测奥沙利铂以及联用铜螯合剂四硫代钼酸盐(tetrathiomolybdate,TTM)对MKN-45及BGC-823胃癌细胞的毒性作用;免疫荧光/蛋白质免疫印迹分析铜死亡核心指征蛋白DLAT在线粒体上寡聚化情况及铜死亡调控蛋白FDX1、LIAS的表达;铜离子荧光探针检测OXA及TTM处理后胞内铜离子水平。将5~6周龄SPF级Balb/c nude雌性小鼠(体质量18~25 g)皮下注射胃癌MKN-45细胞建立皮下移植瘤模型,分为(n=4):对照组(Control组)、奥沙利铂治疗组(OXA组,腹腔注射OXA)及奥沙利铂联用四硫代钼酸盐治疗组(OXA+TTM组,腹腔注射OXA及TTM),定期记录肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线。肿瘤组织经包埋切片后行免疫组化染色检测铜死亡核心调控蛋白(FDX1、LIAS)的表达情况及铜盐染色检测组织内铜离子水平。**结果** 胃癌组织中FDX1、DLAT较正常组织表达升高(P<0.001),且FDX1、LIAS、DLAT均与胃癌预后相关(P<0.001),奥沙利铂抑制MKN-45、BGC-823细胞增殖(24 h IC_{50}为44.89 μmol/L、19.02 μmol/L),奥沙利铂诱导的细胞毒性被铜螯合剂TTM显著拮抗(P<0.001);奥沙利铂诱导DLAT发生显著的线粒体定位寡聚化、胞内铜蓄积及FDX1和LIAS表达下降。动物实验中奥沙利铂单药显著抑制肿瘤生长(P<0.01),该效应被四硫代钼酸盐削弱(P<0.001)。奥沙利铂单药组肿瘤中FDX1与LIAS蛋白表达水平显著低于对照组及OXA+TTM联合组,以及铜盐染色提示奥沙利铂治疗组可见细胞内铜离子水平明显升高,与体外结果一致。**结论** 奥沙利铂可通过诱导胃癌细胞铜死亡抑制胃癌的进展。

[关键词] 胃癌;铜死亡;奥沙利铂;四硫代钼酸盐

[中图法分类号] R735.2;R966;R979.12 [文献标志码] A

Oxaliplatin suppresses gastric cancer by inducing cuproptosis

RAO Hang[1], YANG Hong[2], XIONG Mengyuan[1], ZHANG Liyong[1], HAN Xiao[2], DENG Boshao[2], WANG Lulu[2], CHEN Jian[2], SHI Yan[1] [1]Department of General Surgery, First Affiliated Hospital (Southwest Hospital); [2]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the capacity of oxaliplatin (OXA) in inducing cuproptosis in treatment of gastric cancer and explore the underlying mechanisms. **Methods** Kaplan-Meier Plotter was

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82372807);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0597)

* 同等贡献者

[通信作者] 石 彦,E-mail:shiyanpwk@tmmu.edu.cn;
陈 戬,E-mail:chenjian1@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:饶航,杨虹,熊梦源,等. 奥沙利铂通过诱导胃癌细胞铜死亡抑制胃癌[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(24):3056-3064. DOI:10.16016/j.2097-0927.202509094.

Citation: RAO H, YANG H, XIONG M Y, *et al*. Oxaliplatin suppresses gastric cancer by inducing cuproptosis[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(24): 3056-3064. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202509094.

used to analyze the data in UALCAN database to explore the key regulatory proteins involved in cuproptosis, dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT), ferredoxin 1 (FDX1) and lipoic acid synthase (LIAS) in gastric cancer. The cytotoxic effects of OXA alone and in combination with copper chelator tetrathiomolybdate (TTM) were determined using CCK-8 assays. Immunofluorescence assay and Western blotting were employed to assess the mitochondrial oligomerization of DLAT and the expression levels of FDX1 and LIAS. Intracellular copper levels were measured using a copper-specific fluorescent probe following treatment with OXA and TTM. A subcutaneous tumor model was established through subcutaneous injection of gastric cancer MKN-45 cells in SPF-grade female Balb/c nude mice (5~6 weeks old, weighing 18~25 g). Then the nude mice were randomly assigned into control group, OXA treatment group (intraperitoneal injection), and OXA and tetrasolybdate (TTM) treatment group. Tumor size was monitored regularly to plot a tumor growth curve. Tumor tissues were harvested, embedded in paraffin, sectioned and then subjected to immunohistochemical (IHC) staining to evaluate expression of FDX1 and LIAS. Copper staining was performed to assess copper levels in tumor tissues. **Results** The expression levels of FDX1 and DLAT were significantly elevated in gastric cancer tissues than normal tissues (P<0.001), and the expression levels of FDX1, DLAT and LIAS were associated with the prognosis of gastric cancer. OXA treatment inhibited cell proliferation in both MKN-45 and BGC-823 cells, with the IC_{50} values of 44.89 and 19.02 μmol/L, respectively. Its cytotoxicity was significantly attenuated by TTM (P<0.001). OXA induced pronounced mitochondrial oligomerization of DLAT, intracellular copper accumulation, and reduced FDX1/LIAS expression. In nude mice of transplanted tumor, OXA monotherapy significantly suppressed tumor growth (P<0.01), which was weakened by TTM treatment (P<0.001), and decreased the protein levels of FDX1 and LIASr than those in the control and OXA+TTM groups. Copper staining revealed elevated intracellular copper levels in the OXA-treated group, consistent with *in vitro* findings. **Conclusion** OXA inhibits the progression of gastric cancer by inducing cuproptosis in tumor cells.

[**Key words**] gastric cancer; cuproptosis; oxaliplatin; tetrathiomolybdate

RAO Hang and YANG Hong contributed equally to the article. Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82372807) and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0597). Corresponding authors: SHI Yan, E-mail: shiyanpwk@tmmu.edu.cn; CHEN Jian, E-mail: chenjian1@tmmu.edu.cn

胃癌(gastric cancer,GC)是一种常见的消化道恶性肿瘤,2022年全球胃癌新发病例超过968 000例,死亡人数约660 000人,胃癌的发病率和病死率均位居全球第五[1-2]。化疗是目前胃癌患者除手术切除之外的主要治疗方法,奥沙利铂(oxaliplatin,OXA)是目前胃癌患者的一线化疗方案药物[3]。OXA是第三代铂类化疗药物,其主要通过铂原子与DNA碱基之间形成共价交联来阻碍DNA复制,最终导致细胞凋亡[4]。研究表明,OXA与表观遗传修饰、DNA修复、细胞代谢及细胞凋亡等生物过程相关[5-6]。因此,解析奥沙利铂治疗分子机制对于提高其治疗效果、寻找新颖有效的治疗靶点具有重要临床意义。

铜死亡(cuproptosis)是一种由铜离子异常蓄积诱导的程序性细胞死亡形式,与其他细胞死亡例如细胞凋亡、铁死亡、坏死性凋亡和自噬不同。在铜离子沉积过程中,Cu^{2+}通过铁氧还蛋白1(ferredoxin 1,FDX1)转化为Cu^{+},并通过线粒体离子载体递送。增加的Cu^{+}直接与二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase,DLAT)结合,导致脂质酰化蛋白质聚集和Fe-S簇蛋白丢失,从而触发蛋白质毒性应激,最终导致细胞死亡[7-11]。

铜是生物体必需的微量元素,参与细胞生长及新陈代谢过程[8-9]。研究表明,铜是细胞信号转导的关键因子[10-11],其可通过刺激细胞增殖、血管生成和转移[12-13],促进胃癌、结直肠癌等癌症的发生发展[14-15]。因此肿瘤细胞比正常细胞需要更多的铜离子来维持其发展[16]。有研究表明铂类药物在杀伤肿瘤细胞的同时可干扰细胞内的铜离子稳态[17-18]。

OXA对肿瘤细胞的杀伤作用是否与铜稳态相关目前尚无研究,其能否诱导胃癌细胞铜死亡以及潜在的分子机制仍然未知。因此,本研究使用OXA及四硫代钼酸盐(Tetrathiomolybdate,TTM)干预皮下移植瘤小鼠,

观察二者对裸鼠皮下移植瘤的影响,并分析其机理,为OXA临床治疗胃癌提供新的作用靶点及理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与处理

本实验所用的人胃癌细胞系(MKN-45、BGC-823)原始株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。并在陆军军医大学基础医学院免疫学教研室补体生物学实验室内部扩增并于液氮中长期保存。细胞于37 ℃水浴复苏后接种于含10%胎牛血清(Servicebio,中国)和1%青链霉素混合液(Servicebio,中国)的RPMI-1640培养基(Gibco,中国)中,并于37 ℃、5%CO_2恒温恒湿培养箱中培养。奥沙利铂(阿拉丁,中国)使用高压灭菌双蒸水溶解配制为5 mmol/L储存液,滤菌后分装保存于-20 ℃。细胞实验使用培养基将储存液稀释至0、3.125、6.250、12.500、20.000、25.000、50.000、100.000、200.000、400.000 μmol/L工作液,持续处理细胞24 h。铜螯合剂四硫代钼酸盐(MedChemExpress,中国)使用DMSO配制为5 mmol/L储存液,培养基稀释到20 μmol/L后和奥沙利铂共处理细胞24 h。

1.2 实验动物与肿瘤模型

5~6周龄SPF级Balb/c nude雌性小鼠(体质量18~25 g),购自塞业(苏州)生物科技有限公司[动物许可证号:110324230101159241;动物合格证号:SYXK(渝)2022-0018],饲养于陆军军医大学免疫学教研室动物房,室温20~26 ℃。本实验已得到陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20242039)。小鼠适应性饲养1周后,按照随机数字表格法将12只小鼠随机分为:对照组(Control组)、OXA治疗组(OXA组,腹腔注射OXA 5 mg/kg)及OXA联用TTM治疗组(OXA+TTM组,腹腔注射OXA 5 mg/kg及TTM 5 mg/kg)。将5×10^6个MKN-45细胞皮下注射到小鼠右侧背部,构建小鼠胃癌移植瘤模型。3天后检查小鼠成瘤情况,体积达到50 mm^3后开始腹腔注射OXA及TTM,监测并记录肿瘤体积,使用以下公式测定:肿瘤体积=(长度×宽度^2)/2。15~20天后1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉后颈椎脱臼处死小鼠,并取出肿瘤称量用于后续实验。

1.3 生物信息学分析

使用UALCAN数据库(http://ualcan.path.uab.edu)分析来自TCGA-STAD队列中的415个肿瘤样本和34个正常样本的RNA测序数据中胃癌组织及正常组织中LIAS、FDX1、DLAT表达,其中P阈值设置为0.05。使用在线Kaplan-Meier绘图仪工具(https://kmplot.com/analysis/index.php?p=background)对与不同水平的LIAS、FDX1、DLAT表达相关的患者总体生存期(overall survival,OS)进行评估。

1.4 铜离子荧光染色

MKN-45及BGC-823细胞培养至对数生长期,经胰酶消化后在4 ℃下以1 000 r/min离心5 min后重悬,分为3组:对照组(Control组)、OXA治疗组(OXA组)及OXA联用TTM治疗组(OXA+TTM组),接种于24孔板中细胞爬片,每孔接种500 μL(含细胞1×10^5个)。对应药物处理24 h后用PBS洗5 min(3次)后,吸去PBS;使用4%多聚甲醛进行固定,PBS洗5 min(3次),吸去PBS;用含0.1%TritonX-100的PBS通透10 min,加入PBS洗5 min(3次),吸去PBS。加入铜离子荧光探针(Solarbio,中国),37 ℃孵育2 h。PBS洗5 min(3次),吸去PBS,将切片用含DAPI的封片剂固定于载玻片上,用荧光显微镜观察并获取图像。

1.5 CCK-8实验

MKN-45及BGC-823细胞培养至对数生长期,经胰酶消化后在4 ℃下以1 000 r/min离心5 min后,用培养基重悬细胞后将细胞接种于96孔板,分为不同浓度的OXA(0、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000、400.000 μmol/L)处理组,以及对照组(Control组)、奥沙利铂治疗组(OXA组)及奥沙利铂联用四硫代钼酸盐治疗组(OXA+TTM组),每个处理组5个复孔,每孔接种200 μL(含细胞5×10^3个)。在药物处理24 h后每孔加入100 μL含10%CCK-8试剂的培养基,培养箱避光孵育20~30 min后使用酶标仪测定在450 nm处的吸光度[A(450)]值。

1.6 蛋白质免疫印迹实验

使用含有1%PMSF的RIPA裂解缓冲液提取MKN-45及BGC-823细胞总蛋白,NanoDrop测定蛋白浓度,在150 V下进行SDS-PAGE电泳分离,并将蛋白电转(200 mA,1 h)至PVDF膜上。PVDF膜用5%BSA封闭后放入配置好的一抗工作液,山羊抗兔FDX1单抗(1∶1 000,proteintech,中国),山羊抗兔LIAS单抗(1∶1 000,proteintech,中国),山羊抗兔α-Tubulin单抗(1∶1 000,Beyotime,中国),4 ℃孵育过夜,TBST洗涤后加入HRP标记的二抗(1∶1 000,Beyotime,中国)室温孵育1 h;再次TBST洗涤后进行曝光。

1.7 免疫荧光实验

细胞经消化、重悬后接种至细胞爬片至80%融合度,分为:对照组(Control组)、OXA治疗组(OXA组)及OXA联用TTM治疗组(OXA+TTM组),药物处理12 h后PBS洗5 min(3次)后使用Mito-Tracker Red CMXRos(1∶200,中国)线粒体染色,室温孵育10~15 min,PBS洗5 min(3次),吸去PBS;使用4%多聚甲醛进行固定,

PBS洗5 min(3次),吸去PBS;用5%牛血清白蛋白封闭30 min;用含0.1%TritonX-100的PBS通透30 min,加入PBS洗5 min(3次),吸去PBS。加入anti Rabbit DLAT一抗(1∶200,proteintech,中国),4 ℃孵育过夜。吸去一抗,加入PBS洗5 min(3次),吸去PBS,加入CoraLite488-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(1∶200,proteintec,中国)的二抗,室温孵育2 h,PBS洗5 min(3次),吸去PBS,将切片用含DAPI的封片剂固定于载玻片上,用荧光显微镜观察并获取图像。

1.8　免疫组化染色实验

裸鼠MKN-45细胞皮下移植瘤经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后的组织切片依次经脱蜡、梯度酒精处理、流水冲洗、抗原修复(枸橼酸钠100 ℃ 15 min)、去除内源性过氧化物酶(3%过氧化氢)、5%BSA封闭,LIAS、FDX1一抗孵育(4 ℃过夜),孵育二抗(30 min),DAB显色,苏木素复染(30 s)、反蓝、脱水封片处理后,在200倍的放大倍率镜下拍照。

1.9　铜盐染色实验

石蜡切片经脱蜡、梯度酒精处理、流水冲洗,按铜盐染色试剂(Solarbio,中国)说明,切片入红氨酸染色液,37 ℃恒温浸染48 h,75%乙醇处理5 min,蒸馏水洗涤后滴加核固红染色液3 min,蒸馏水冲洗后常规脱水后中性树胶封固后,在200倍的放大倍率镜下拍照。

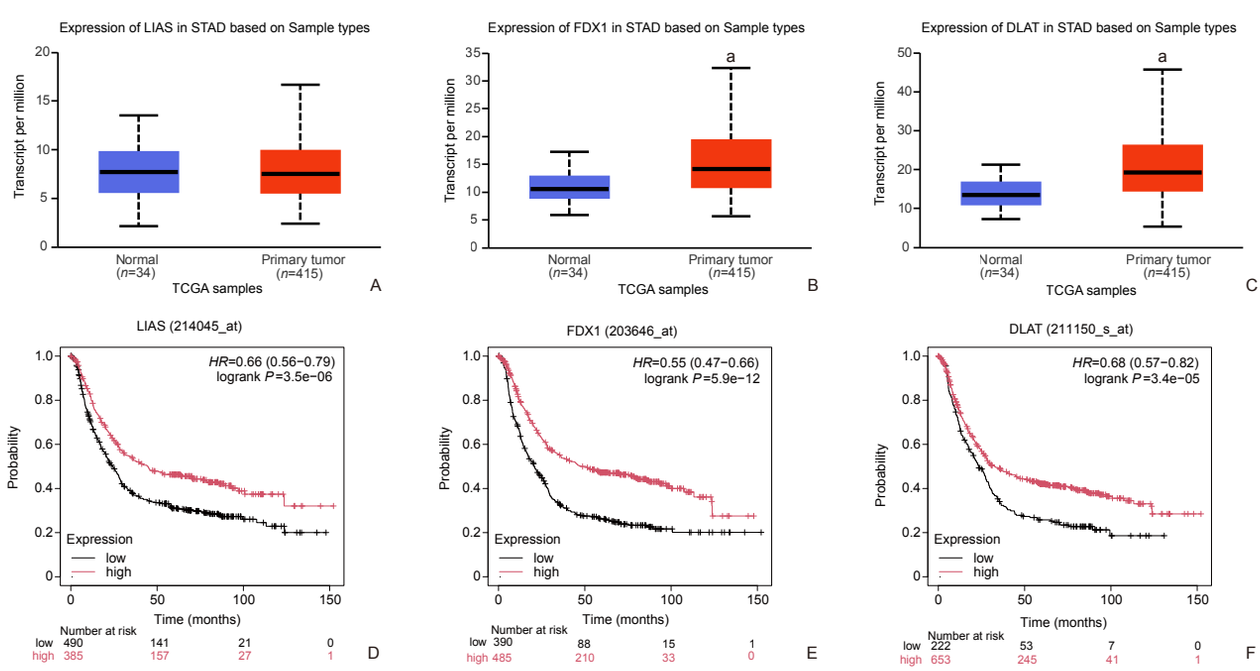
1.10　统计学分析

采用GraphPad Prism 10软件进行统计处理。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。两组数据间的差异采用非配对双尾t检验进行分析;而多组数据间的差异比较,经单因素方差检验后,通过Tukey多重比较事后检验进行组间差异分析。P<0.05认为差异具有统计学意义。所有实验重复3次(生物学重复),确保结果的可靠性及稳定性。

2　结果

2.1　铜死亡关键蛋白在胃癌组织与正常组织中存在差异且与胃癌患者预后存在相关性

为探索铜死亡在胃癌中的作用,利用在线数据库分析铜死亡的关键蛋白硫辛酸合成酶(lipoic acid synthase,LIAS)、FDX1、DLAT在胃癌组织中与正常组织的表达情况。采用数据库中415个肿瘤样本和34个正常样本的RNA测序数据分析,LIAS在肿瘤组织中的表达与正常组织无差异(图1A),FDX1与DLAT在肿瘤组织中的表达均高于正常组织(图1B、C)。进一步分析相关蛋白与胃癌患者的总生存期发现,高表达铜死亡核心调控蛋白LIAS、FDX1、DLAT的胃癌患者



A~C: Expression of LIAS (A), FDX1 (B) and DLAT (C) in gastric cancer tissues and normal tissues; D~F: Overall survival (OS) in gastric cancer patients with different expression levels of LIAS (D), FDX1 (E) and DLAT (F). DLAT: Dihydrolipoamide S-acetyltransferase; FDX1: Ferredoxin 1; LIAS: Lipoic acid synthase; a: P<0.001, compared with the normal group

图1　铜死亡核心调控蛋白在胃癌中的表达及预后

Figure 1　Expression and prognosis of cuproptosis core regulatory proteins in gastric cancer

较低表达的患者预后较好(图1D~F),这表明铜死亡与胃癌的发展过程中存在一定的联系,同时也提示铜死亡在胃癌的临床治疗上可能具有巨大的价值。

2.2 奥沙利铂对胃癌MKN-45细胞的细胞毒性

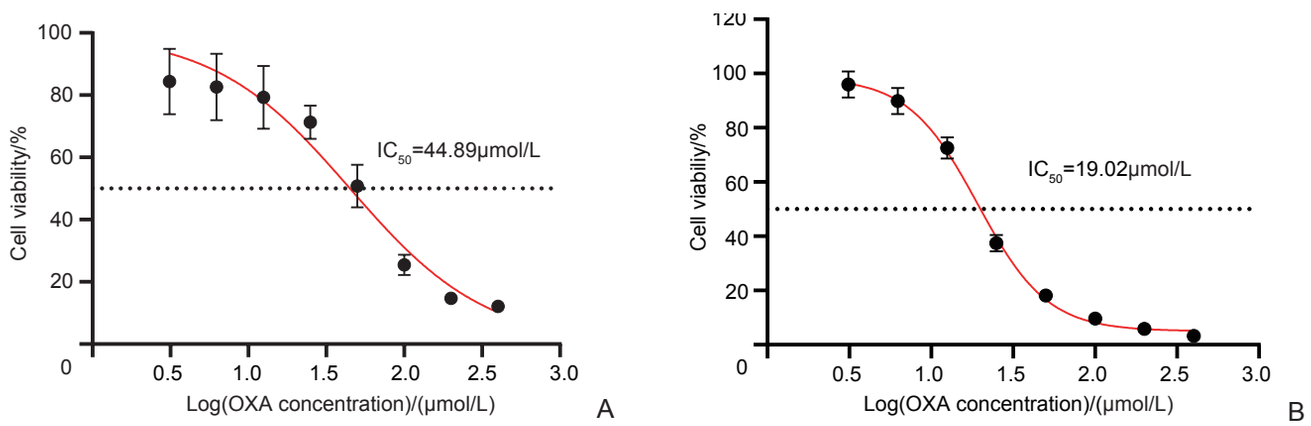
OXA是胃癌患者的一线化疗用药,为进一步探索OXA杀伤胃癌细胞的机制,使用不同浓度的OXA(0、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000、400.000 μmol/L)处理MKN-45细胞24 h,OXA显著抑制人胃癌细胞MKN-45增殖,其24 h IC_{50}值为44.89 μmol/L(图2A)。同样实验条件处理BGC-823细胞,其24 h IC_{50}值为19.02 μmol/L(图2B)。当OXA浓度为12.5 μmol/L时,细胞活力显著下降。因此,选择浓度为20 μmol/L的OXA进行后续试验。

2.3 奥沙利铂的铜依赖性

既往的研究表明铂类药物可通过劫持铜转运蛋白破坏细胞铜稳态,提示OXA可能通过诱导铜死亡发挥抗癌作用;TTM是一种铜螯合剂,其主要通过降低生物可利用铜浓度干预铜死亡过程。当联合TTM(20 μmol/L)处理细胞时,OXA诱导的细胞毒性被显著抑制(P<0.001,图3),提示OXA对胃癌MKN-45、BGC-823细胞的毒性作用依赖于铜离子稳态。

2.4 奥沙利铂诱导胃癌细胞铜离子蓄积

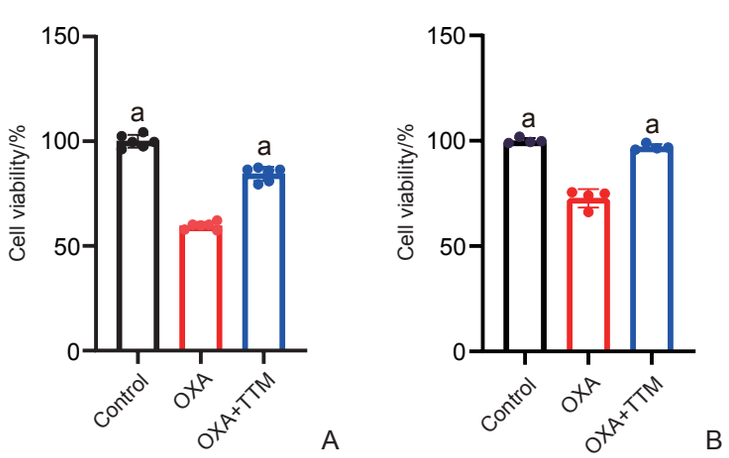
为进一步探究OXA是否通过调节细胞铜离子稳态杀伤胃癌细胞,通过铜离子荧光探针染色确定OXA处理胃癌MKN-45、BGC-823细胞后可见明显的铜离子蓄积,其余处理组均未见明显的铜离子蓄积(图4)。



A, B: Impact of oxaliplatin (OXA) on cell viability in gastric cancer MKN-45 (A) and BGC-823 (B) cells

图2 奥沙利铂对胃癌MKN-45、BGC-823细胞活性的影响

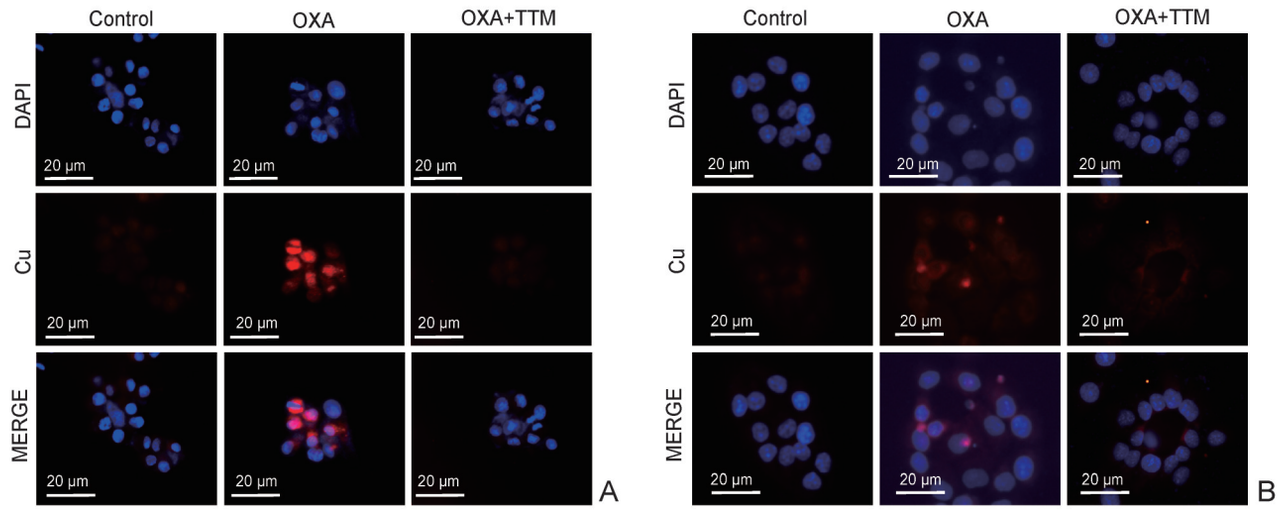
Figure 2 Impact of oxaliplatin on cell viability in gastric cancer MKN-45 and BGC-823 cells



A, B: Effect of combination of oxaliplatin (OXA) and copper chelator TTM on the viability of MKN-45 (A) and BGC-823 (B) cells
a: P<0.001, compared with the OXA group.

图3 奥沙利铂的铜依赖性

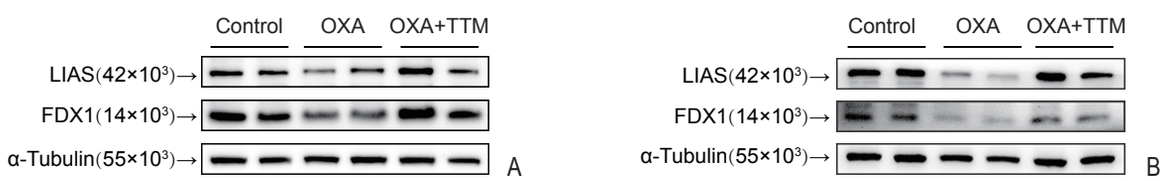
Figure 3 Copper-dependence of oxaliplatin



A, B: Representative fluorescence images of copper ion fluorescence probe in MKN-45 (A) and BGC-823 (B) cells

图4 奥沙利铂诱导胃癌细胞内铜离子的蓄积

Figure 4 Oxaliplatin (OXA) induces copper ion accumulation in gastric cancer cells



A, B: Representative Western blotting images of LIAS and FDX1 protein levels in gastric cancer MKN-45 (A) and BGC-823 (B) cells

图5 奥沙利铂下调铜死亡核心调控蛋白

Figure 5 Oxaliplatin (OXA) downregulates the core regulatory proteins in cuproptosis

2.5 奥沙利铂下调铜死亡核心调控蛋白

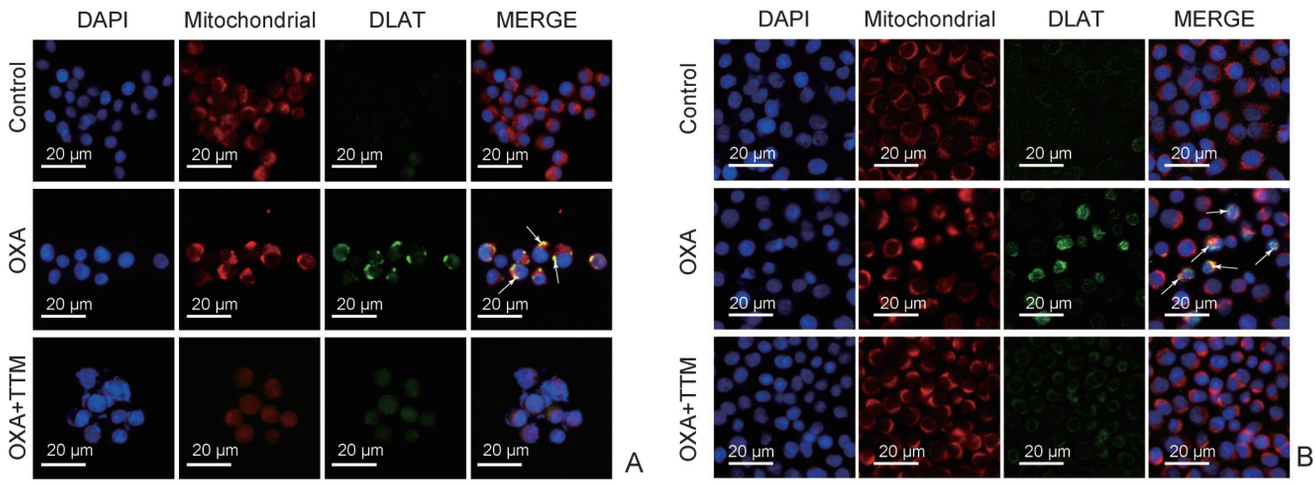
为探索OXA与铜死亡之间的联系,蛋白质免疫印迹检测对照组与OXA组之间铜死亡核心调控蛋白LIAS、FDX1的表达差异。结果显示,与对照组相比,OXA处理组LIAS、FDX1表达水平降低,加入铜死亡抑制剂TTM后,LIAS和FDX1表达水平显著上调(图5)。

2.6 奥沙利铂诱导胃癌细胞DLAT线粒体寡聚化

由于OXA能诱导胃癌细胞中铜离子蓄积同时下调铜死亡调控蛋白(FDX1、LIAS),因此本研究推测其可诱导胃癌细胞铜死亡。为验证该推测,通过免疫荧光染色检测不同处理组中铜死亡核心指征DLAT寡聚化变化。结果显示,OXA处理组中DLAT在线粒体上存在明显寡聚化表现,加入TTM后该现象被逆转(图6),表明OXA可以诱导DLAT蛋白在线粒体发生异常寡聚化,形成不溶性的蛋白聚集体在线粒体内积累,导致蛋白质毒性应激,最终引发细胞铜死亡。

2.7 奥沙利铂通过诱导胃癌细胞铜死亡抑制胃癌进展

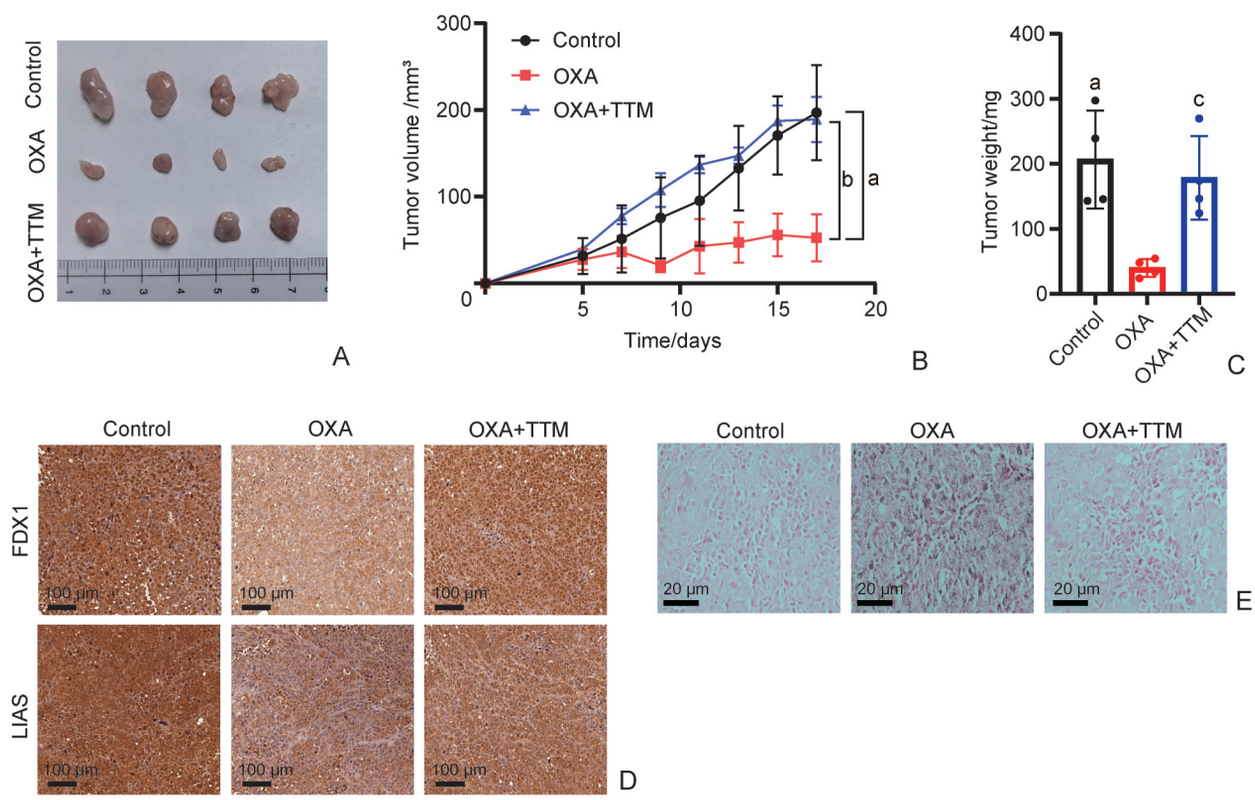
为探究OXA抑制胃癌细胞体内生长的作用机制,采用MKN-45细胞建立裸鼠皮下移植瘤模型,1%戊巴比妥钠腹腔麻醉后颈椎脱臼处死小鼠后获取肿瘤(图7A),结果显示,与对照组相比,OXA治疗组肿瘤体积被显著抑制($P<0.001$,图7B),且肿瘤重量显著减小(图7C);相对于OXA组,OXA联用TTM组肿瘤的抑制作用明显降低($P<0.05$,图7B)。将肿瘤组织包埋切片后行免疫组化染色,结果提示与对照组相比,OXA治疗组肿瘤组织中铜死亡核心调控蛋白FDX1、LIAS的表达明显下调(图7D),该下调被铜死亡抑制剂TTM逆转。小鼠移植瘤组织铜盐染色表明,OXA治疗组可见明显铜离子蓄积情况(图7E),OXA+TTM组铜离子蓄积情况降低。上述结果均与体外细胞实验结果一致。以上结果表明在动物水平OXA可诱导胃癌细胞铜死亡抑制胃癌进展。



A, B: Representative immunofluorescence images of MKN-45 (A) and BGC-823 (B) cells after 12 h of treatment with OXA and OXA+TTM

图6 奥沙利铂诱导胃癌细胞DLAT线粒体寡聚化

Figure 6 Oxaliplatin (OXA) induced mitochondrial oligomerization of DLAT in gastric cancer cells



A: Gross images of subcutaneous xenograft tumor mass harvested from nude mice after euthanasia; B: Growth curve of subcutaneous transplanted tumors in nude mice; C: Statistical analysis of tumor tissue weight; D: Immunohistochemical staining of cuproptosis core regulatory proteins in subcutaneous xenograft tumor tissues of nude mice; E: Copper salt staining of subcutaneous xenograft tumor tissues of nude mice. a: $P<0.01$, c: $P<0.05$, b: $P<0.001$, compared with the OXA group

图7 奥沙利铂通过诱导胃癌细胞铜死亡抑制胃癌进展

Figure 7 Oxaliplatin inhibits gastric cancer progression by inducing cuproptosis in gastric cancer cells

3 讨论

3.1 FDX1/LIAS下调导致蛋白脂酰化及寡聚化从而诱导铜死亡

铜死亡的进展受到核心调控因子FDX1与LIAS的调控,它们的表达水平影响了细胞对铜死亡的敏感性。FDX1和LIAS作为铜死亡的关键调控节点,其在线粒体铁硫簇生物合成和蛋白质脂酰化方面发挥着重要的作用,FDX1主要将胞质内Cu^{2+}还原为Cu^{+}[7]。本研究推测,当FDX1下调时可能会减少Cu^{2+}向Cu^{+}的转化,从而导致细胞内的铜蓄积。并可能通过双重途径促进铜毒性或抑制硫辛酰化修饰,从而破坏三羧酸循环相关酶复合体的稳定性。LIAS为硫辛酸合成的关键酶,其下调会导致细胞内源性的硫辛酸供应不足。而硫辛酸是丙酮酸脱氢酶复合体等进行脂酰化修饰必不可少的辅因子。因此,FDX1的缺失将直接抑制这些关键代谢酶的脂酰化过程,进而影响其稳定性与功能,导致三羧酸循环的紊乱,并可能引发线粒体呼吸链的功能障碍及酶蛋白(例如DLAT)的异常寡聚化。LIAS的下调进一步削弱了线粒体的铁硫簇合成能力,与FDX1的缺失产生协同作用,加剧了蛋白质的毒性应激。这一系列变化的最直接后果,正如本研究的免疫荧光实验所揭示的,是包括DLAT在内的脂酰化蛋白代谢紊乱并在线粒体中出现寡聚化,破坏了线粒体的功能,诱发了铜死亡[14]。

3.2 奥沙利铂诱导铜死亡的新机制及其临床转化潜力

本研究阐明了奥沙利铂在胃癌治疗中的一种新作用机制——诱导铜死亡,结果表明奥沙利铂不仅会导致胃癌细胞内铜离子的蓄积,还会下调铜死亡的核心调控蛋白FDX1和LIAS,进而促进DLAT在线粒体内的寡聚化,诱导细胞发生铜死亡。这一发现打破了奥沙利铂以引起DNA交联并激活凋亡通路为特性的传统认知[4-5],本研究揭示了铜死亡分子标志物DLAT的线粒体寡聚化,与典型的凋亡、坏死或铁死亡等细胞死亡模式有本质的区别。更重要的是,铜螯合剂在本实验模型中能够逆转奥沙利铂的作用,进一步排除了以上传统通路占主导地位的可能[19]。当然,在奥沙利铂处理的不同阶段或浓度下,并不能否认多种细胞死亡机制并存的可能。本研究明确提示了铜死亡在奥沙利铂对胃癌的治疗过程中扮演了至关重要的角色,这一发现不仅为铂类化疗药物的作用机制开辟了新的维度,也将经典的化疗药物与新兴的铜死亡及铜代谢领域紧密地联系起来。那么,奥沙利铂究竟是如何导致细胞内铜蓄积的呢?初步推测,这一过程可能涉及奥沙利铂或其代谢产物对铜摄入转运蛋白(例如CTR1)的直接影响,或是对铜外排泵(如ATP7A/ATP7B)功能的抑制[20-21],从而导致细胞内铜蓄积现象的发生。这一假设为后续的研究提供了重要的线索和方向。在临床实践层面,本研究同样具有深远的意义。它提示肿瘤细胞内铜代谢通路的状态(例如LIAS、FDX1的表达水平)有望成为预测胃癌患者对奥沙利铂化疗敏感性的新型生物标志物。这一发现也为克服铂类耐药提供了全新的治疗策略,通过联合使用铜离子载体或靶向铜代谢的关键蛋白,或许能够在传统的DNA损伤途径之外,协同增强奥沙利铂的疗效,甚至逆转因代谢清除增强所导致的奥沙利铂耐药。这一研究方向无疑为胃癌患者的化疗方案带来了新的希望。

3.3 本研究的局限性与展望

本研究虽采取了一系列措施来增强研究结论的可靠性和普适性。但在某方面存在一定的局限性:①体外实验的样本量相对较小,这在一定程度上限制了统计效力。但体内动物模型的数据为我们提供了强有力的支持。在体内动物模型中观察到了与体外实验高度一致的趋势,包括奥沙利铂对肿瘤生长抑制的逆转、移植瘤组织切片中LIAS/FDX1的下调以及铜含量的增加。体内外数据的相互印证极大地增强了结论的可信度。②本研究还未进一步明确FDX1/LIAS下调是奥沙利铂的直接作用靶点,还是铜蓄积的次级效应。为了弥补这一缺陷,拟将在未来的研究中进一步构建FDX1/LIAS过表达或敲低的细胞模型,以验证其在奥沙利铂治疗中的作用,并完善机制研究。③本研究主要依赖于裸鼠皮下移植瘤模型,未来的研究我们将采用更先进的原位瘤模型或患者来源的类器官模型。④动物研究队列中样本量相对较小,在较大的效应量下我们观察到了统计学上的显著差异,但这种有限的样本量可能会降低检测更细微影响的统计功效。未来有必要对更大的动物队列进行研究,以进一步证实这些发现。

本研究应用在线数据库分析、细胞实验及胃癌裸鼠皮下移植瘤模型,阐述了奥沙利铂对肿瘤杀伤作用的一种新机制。本研究表明,奥沙利铂能通过干扰细胞内铜稳态,进而引发胃癌细胞发生铜死亡。在线数据库的分析结果提示,铜死亡关键调控蛋白在胃癌组织中表达异常,高表达的铜死亡调控蛋白与患者不良预后有关,为本研究提供了相关联的临床基础。进一步的细胞实验表明,奥沙利铂处理明显诱导了胃癌细

胞内铜离子蓄积;联用铜螯合剂四硫代钼酸盐不仅逆转了奥沙利铂的细胞毒性,同时也在体内裸鼠皮下移植瘤模型中抑制了奥沙利铂的抗肿瘤作用。这些发现证实了铜离子的蓄积是奥沙利铂发挥肿瘤杀伤作用的关键因素,为理解奥沙利铂的抗肿瘤机制提供了新方向。

综上所述,本研究阐述了诱导胃癌细胞铜死亡可能是奥沙利铂的新机制,拓宽了对铂类药物作用机制的理解,并为临床胃癌化疗策略的优化提供了新靶点和理论依据。未来我们的研究将深入探索奥沙利铂调控铜摄入/外排的具体分子机制,并评估在此情况下铜死亡增敏的联合疗法在临床前模型中的可行性,以期进一步提升胃癌治疗效果。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] THRIFT A P, WENKER T N, EL-SERAG H B. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(5): 338-349. DOI:10.1038/s41571-023-00747-0.

[2] SUNDAR R, NAKAYAMA I, MARKAR S R, *et al*. Gastric cancer[J]. Lancet, 2025, 405(10494): 2087-2102. DOI: 10.1016/S0140-6736(25)00052-2.

[3] WANG F H, ZHANG X T, TANG L, *et al*. The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO): Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer, 2023[J]. Cancer Commun, 2024, 44(1): 127-172. DOI:10.1002/cac2.12516.

[4] LORD C J, ASHWORTH A. The DNA damage response and cancer therapy[J]. Nature, 2012, 481(7381): 287-294. DOI:10.1038/nature10760.

[5] ROTTENBERG S, DISLER C, PEREGO P. The rediscovery of platinum-based cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(1): 37-50. DOI:10.1038/s41568-020-00308-y.

[6] BURGER H, LOOS W J, EECHOUTE K, *et al*. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance[J]. Drug Resist Updat, 2011, 14(1): 22-34. DOI:10.1016/j.drup.2010.12.002.

[7] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, *et al*. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. Science, 2022, 375(6586): 1254-1261. DOI: 10.1126/science.abf0529.

[8] KARDOS J, HÉJA L, SIMON Á, *et al*. Correction to: Copper signalling: causes and consequences[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16: 80. DOI:10.1186/s12964-018-0277-3.

[9] XIAO Y, WANG T, SONG X, *et al*. Copper promotion of myocardial regeneration[J]. Exp Biol Med, 2020, 245(10): 911-921. DOI:10.1177/1535370220911604.

[10] FUKAI T, USHIO-FUKAI M, KAPLAN J H. Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(2): C186-C201. DOI:10.1152/ajpcell.00132.2018.

[11] CHEN L Y, MIN J X, WANG F D. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease[J]. Sig Transduct Target Ther, 2022, 7: 378. DOI:10.1038/s41392-022-01229-y.

[12] MAJUMDER S, CHATTERJEE S, PAL S, *et al*. The role of copper in drug-resistant murine and human tumors[J]. Biometals, 2009, 22(2): 377-384. DOI: 10.1007/s10534-008-9174-3.

[13] STEPIEN M, JENAB M, FREISLING H, *et al*. Pre-diagnostic copper and zinc biomarkers and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort[J]. Carcinogenesis, 2017, 38(7): 699-707. DOI:10.1093/carcin/bgx051.

[14] SUN L H, ZHANG Y, YANG B Y, *et al*. Lactylation of METTL16 promotes cuproptosis *via* m6A-modification on FDX1 mRNA in gastric cancer[J]. Nat Commun, 2023, 14: 6523. DOI:10.1038/s41467-023-42025-8.

[15] NAYAK S B, BHAT V R, UPADHYAY D, *et al*. Copper and ceruloplasmin status in serum of prostate and colon cancer patients[J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2003, 47(1): 108-110.

[16] BRADY D C, CROWE M S, TURSKI M L, *et al*. Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis[J]. Nature, 2014, 509(7501): 492-496. DOI: 10.1038/nature13180.

[17] LASORSA A, NARDELLA M I, ROSATO A, *et al*. Mechanistic and structural basis for inhibition of copper trafficking by platinum anticancer drugs[J]. J Am Chem Soc, 2019, 141(30): 12109-12120. DOI:10.1021/jacs.9b05550.

[18] SAFAEI R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs[J]. Cancer Lett, 2006, 234(1): 34-39. DOI:10.1016/j.canlet.2005.07.046.

[19] MILLS C F, EL-GALLAD T T, BREMNER I, *et al*. Copper and molybdenum absorption by rats given ammonium tetrathiomolybdate[J]. J Inorg Biochem, 1981, 14(2): 163-175. DOI:10.1016/s0162-0134(00)80037-9.

[20] PETRUZZELLI R, MARINIELLO M, DE CEGLI R, *et al*. TFEB regulates ATP7B expression to promote platinum chemoresistance in human ovarian cancer cells[J]. Cells, 2022, 11(2): 219. DOI:10.3390/cells11020219.

[21] HUANG C P, FOFANA M, CHAN J, *et al*. Copper transporter 2 regulates intracellular copper and sensitivity to cisplatin[J]. Metallomics, 2014, 6(3): 654-661. DOI: 10.1039/c3mt00331k.

(**收稿**:2025-09-28;**修回**:2025-12-12)

(编辑 刘秋池)