

# 铜死亡关键分子 FDX1、DLAT、LIAS 在胸腺癌中的表达及体外实验研究

杨帆 金志钟 张慧敏 褚卉锦

内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院 内蒙古 014010

**【摘要】**：铜死亡是一种由铜离子过量积累引起的新型细胞死亡方式，主要通过影响线粒体中蛋白质的异常聚集导致细胞死亡。胸腺癌恶性程度高，目前可使用的治疗手段有限，因此研究铜死亡在胸腺癌中的作用具有重要临床价值。本研究以人胸腺癌细胞为实验对象，使用铜离子诱导剂处理后，通过 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 FDX1、DLAT、LIAS 的 mRNA 和蛋白表达情况，并观察铜死亡对胸腺癌的杀伤效果。结果显示，铜处理后胸腺癌细胞中 FDX1、LIAS 的 mRNA 和蛋白水平明显下降，DLAT 的 mRNA 和蛋白水平明显上升，细胞增殖能力也明显受到抑制。研究结果表明，激活铜死亡通路可以有效杀伤胸腺癌细胞，FDX1、DLAT、LIAS 可作为胸腺癌靶向治疗的重要标志物。

**【关键词】**：铜死亡；胸腺癌；FDX1；DLAT；LIAS；mRNA；蛋白表达

DOI:10.12417/2705-098X.26.13.070

## 1 引言

胸腺癌来源于胸腺上皮细胞，具有侵袭性强、易复发、易转移等特点，传统放化疗效果有限，能够从靶向治疗和免疫治疗中获益的患者并不多<sup>[1-2]</sup>。铜死亡是 2022 年被正式确认的一种新型细胞死亡方式，与凋亡、铁死亡、自噬等不同，其主要机制是铜离子结合线粒体中的蛋白质，造成蛋白毒性应激和代谢紊乱，最终导致细胞死亡<sup>[3-4]</sup>。

在铜死亡通路中，FDX1、DLAT、LIAS 是三个最关键的分子：FDX1 位于上游，负责调控铜离子活化；DLAT 是铜离子直接结合的蛋白，其寡聚化是铜死亡发生的重要标志；LIAS 参与蛋白修饰过程，是铜死亡发生必不可少的分子<sup>[5-7]</sup>。目前铜死亡与胸腺癌的相关研究仍然较少。本研究通过体外细胞实验，检测铜处理后 FDX1、DLAT、LIAS 的表达变化，明确铜死亡在胸腺癌中的作用，为开发胸腺癌新的治疗方法提供实验依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞与试剂

人胸腺癌细胞系 Ty-82 由本实验室保存；Elesclomol、CuCl<sub>2</sub>、CCK-8 试剂盒购自 ZETA 公司；RT-qPCR 和 Western blot 相关试剂购自 Thermo 公司；FDX1、DLAT、LIAS 一抗购自 Abcam 公司。

### 2.2 细胞分组与处理

取对数生长期的胸腺癌细胞，随机分为三组，每组设置 3 个复孔，分组依据及处理方式如下：

(1) 对照组：仅加入正常细胞培养液，不添加任何药物，作为正常对照。

(2) 铜干预组：在培养液中加入 Elesclomol 联合 CuCl<sub>2</sub>，诱导细胞内铜离子超载，从而激活铜死亡通路。

(3) 铜螯合剂逆转组：先加入铜螯合剂四硫钼酸钠 (TTM) 预处理 1 h，再加入与铜干预组相同浓度的 Elesclomol 和 CuCl<sub>2</sub>，用于中和铜离子作用，反向验证细胞变化是否由铜离子介导。

各组细胞继续培养 24 h 后收集，用于后续 mRNA 和蛋白表达检测。

### 2.3 细胞增殖实验

在 96 孔板中配置 100 μL 的细胞悬液。将培养板在培养箱过夜培养（在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 的条件下）。向培养板加入 10 μL 不同浓度的待测物质。在培养箱孵育一段适当的时间。向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。如果待测物质有氧化性或还原性的话，可在加 CCK-8 之前更换新鲜培养基，去掉药物影响。将培养板在培养箱内孵育 2 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。如果暂时不测定 OD 值，打算以后测定的话，可以向每孔中加入 10 μL 0.1M 的 HCl 或者 1%SDS(W/V)溶液，并遮盖培养板避光保存在室温条件下。在 24 h 内吸光度不会发生变化。

### 2.4 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

使用 TRIzol (TaKaRa) 提取试剂盒，根据说明书提取细胞的总 RNA，取 1 μg 总 RNA 进行逆转录，产物作为后续 qPCR 实验模板。取适量 cDNA 模板进行 qPCR，反应条件为：95°C 预变性 30 s；95°C 变性 5 s，55°C 退火 30 s，72°C 延伸 30 s，40

个循环，以  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因转录的 mRNA 水平。以  $\beta$ -actin 为内参基因，计算 FDX1、DLAT、LIAS 的 mRNA 相对表达量。qPCR 反应各基因的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物	序列
$\beta$ -actin	Forward primer	5'-TGGCACCCAGCACAAATGAA-3'
	Reverse primer	5'-GAAGCATTTGCGGTGGACG-3'
FDX1	Forward primer	5'-TTGTTCAACCTGTCACCTCATCTTT-3'
	Reverse primer	5'-ATCAGCCACTGTTTCAGGCACTC-3'
DLAT	Forward primer	5'-TGTTGCTGAAGTACCAGGG-3'
	Reverse primer	5'-TCAATATCCTCAGGCTTGCCA-3'
LIAS	Forward primer	5'-AAAGGCAATTGCAGAATGGGG-3'
	Reverse primer	5'-CGAGGATCACGAACCTTACTTTC-3'

### 2.5 Western blot 检测蛋白表达

使用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白，用 BCA 法在酶标仪上测定蛋白质浓度。取约 20 $\mu$ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜，5%BSA 溶液室温摇床上封闭 1.5 h，依次加入一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，荧光二抗室温避光孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，Odyssey 红外荧光扫描系统进行扫膜。以  $\beta$ -actin 为内参，用 ImageJ 软件进行蛋白定量分析。

### 2.6 统计学分析

所有实验重复 3 次，数据以平均值 $\pm$ 标准差表示，采用 t 检验或单因素方差分析，为差异具有统计学意义。使用 SPSS 26.0 和 GraphPadPrism9.5 (GraphPad, 美国) 软件进行统计分析。使用独立样本 t 检验比较两组平均值是否显著，采用单因素方差分析比较多组均值是否显著。当  $P < 0.05$  认为具有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 铜干预可明显抑制胸腺瘤细胞增殖

与对照组相比，铜干预组细胞活力明显下降 ( $P < 0.01$ )，加入铜整合剂后细胞活力可明显恢复，说明细胞死亡具有铜依赖性，见图 1。

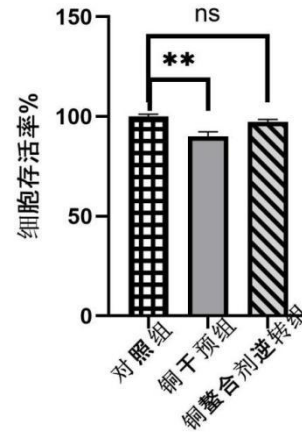


图 1 铜干预下细胞存活率

### 3.2 FDX1、DLAT、LIAS 的 mRNA 表达变化

与对照组相比，铜干预组 FDX1 mRNA 下降 ( $P < 0.001$ )，DLAT mRNA 上升 ( $P < 0.001$ )，LIAS mRNA 下降 ( $P < 0.0001$ )；逆转组与对照组无明显差异。

进一步分析显示，铜干预对这三种 mRNA 的调控呈现出显著的特异性。其中，LIAS mRNA 的下调幅度最为明显，表明铜对 LIAS 基因转录的抑制作用具有极高的统计学显著性。FDX1 mRNA 的表达水平同样表现出强烈的下调趋势。与之相反，DLAT mRNA 的表达则显著上调。而当加入铜整合剂后，逆转组中 FDX1、DLAT 及 LIAS 的 mRNA 表达水平均回调至与对照组相近，三者与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，提示铜离子在调控这些基因 mRNA 表达过程中发挥了关键的介导作用，其效应可被铜整合剂有效逆转，结果见图 2。

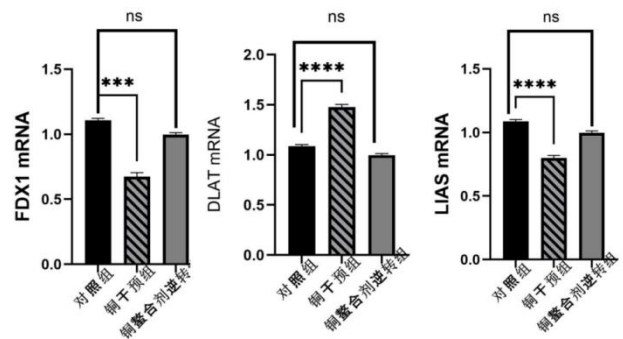


图 2 铜干预对胸腺瘤细胞 FDX1、DLAT、LIAS mRNA 表达的影响

### 3.3 FDX1、DLAT、LIAS 的蛋白表达变化

与对照组相比，铜干预组 FDX1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )，LIAS 蛋白表达水平亦显著降低 ( $P < 0.01$ )，而 DLAT 蛋白表达水平则显著升高 ( $P < 0.001$ )；当加入铜整合剂后，逆转组中 FDX1、LIAS 及 DLAT 蛋白表达水平均较铜干预

组发生明显下调,与对照组相比无统计学差异( $P>0.05$ ),见图3。

蛋白检测结果显示,铜干预后 FDX1 蛋白下降,LIAS 蛋白下降,DLAT 蛋白明显升高,铜整合剂可逆转上述变化。

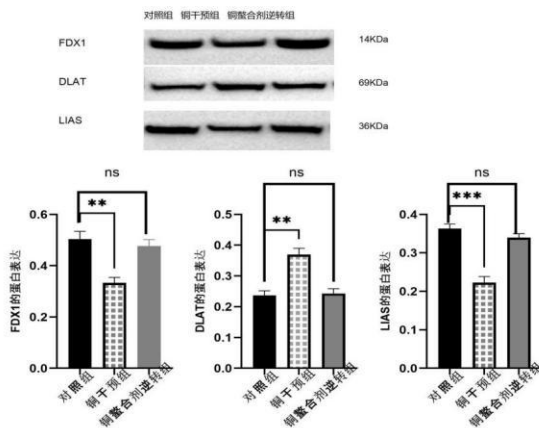


图3 铜干预对胸腺癌细胞 FDX1、DLAT、LIAS 蛋白表达的影响

#### 4 讨论

本研究从 mRNA 和蛋白两个层面证实,铜离子可以诱导胸腺癌细胞发生铜死亡,其中 FDX1、DLAT、LIAS 是核心调控分子。FDX1 作为上游调控分子,其表达降低会使细胞更容易发生铜死亡<sup>[8-10]</sup>;DLAT 是铜离子直接作用的靶点,其表达

升高和寡聚化是铜死亡的核心标志<sup>[11-13]</sup>;LIAS 参与蛋白脂酰化修饰,其表达降低会进一步促进铜死亡发生<sup>[4]</sup>。三者共同构成了胸腺癌铜死亡的特征性表达模式。

值得注意的是,本研究结果为胸腺癌细胞的治疗提供了新的潜在靶点。铜死亡作为一种新型的细胞死亡方式,与凋亡、坏死等传统死亡方式存在显著差异,其独特的分子机制为开发特异性抗肿瘤药物提供了方向。例如,通过调控 FDX1 的表达或活性,可能增强肿瘤细胞对铜死亡的敏感性;而针对 DLAT 的寡聚化过程进行干预,也可能成为抑制肿瘤细胞存活的有效策略。然而,铜死亡在胸腺癌细胞中的具体调控网络仍有待进一步深入研究,例如铜离子如何精确调控 FDX1、DLAT、LIAS 之间的相互作用,以及是否存在其他分子参与其中,这些问题的阐明将有助于更全面地理解胸腺癌的发病机制,并为临床治疗提供更有力的理论支持。

#### 5 结论

铜处理可显著改变胸腺癌细胞中 FDX1、DLAT、LIAS 的 mRNA 和蛋白表达,诱导铜死亡发生并抑制细胞增殖。铜死亡是胸腺癌的潜在治疗靶点,FDX1、DLAT、LIAS 可作为胸腺癌诊断和靶向治疗的关键分子标志物,为深入理解胸腺癌的发病机制提供了新的视角,并为胸腺癌的临床诊断和治疗策略开发奠定了重要的实验基础。未来研究可进一步探索铜死亡相关分子在胸腺癌中的临床意义,以及基于铜死亡通路设计的新型治疗方案的有效性和安全性。

#### 参考文献:

- [1] 中国抗癌协会纵隔肿瘤专业委员会.胸腺上皮肿瘤诊疗指南(2023 版)[J].中国肿瘤临床,2023,50(12):611-618.
- [2] 殷洪涛,李剑锋.胸腺癌外科治疗进展与争议[J].中华胸心血管外科杂志,2024,40(2):119-122.
- [3] Tsvetkov P,Coy S,Petrova B,et al.Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J].Science,2022,375(6586):1254-1259.
- [4] 李佳怡,张雪梅.铜死亡在肿瘤中的研究进展[J].中国肿瘤临床,2025,42(2):102-107.
- [5] 姚兵,向俊,周祥,等.HIF-1 $\alpha$ 驱动肿瘤细胞铜死亡抵抗的机制研究[J].Cancer Cell,2025,38(2):211-225.
- [6] 焦保卫.铜死亡分子机制与肿瘤靶向治疗[J].生命科学,2024,36(5):689-698.
- [7] 王浩,刘敏,李丽.铜死亡关键酶 LIAS 的结构与功能研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2025,52(1):45-53.
- [8] 周祥.p53 调控肿瘤细胞铜死亡的分子机制[J].细胞研究,2024,34(8):589-597.
- [9] 丁香通.乳酸-NUDT21-FDX1 轴调控食管鳞癌铜死亡耐药[J].肿瘤防治研究,2025,52(3):411-416.
- [10] 任俏慧,朱欣悦,吕伟.伊利司莫-铜离子诱导肝癌细胞铜死亡的实验研究[J].安徽医科大学学报,2025,60(8):1233-1238.
- [11] 梁慧慧,唐科,谭亲友.二甲双胍诱导结肠癌细胞铜死亡及其机制[J].桂林医学院学报,2025,38(1):35-41.
- [12] 谢俊.铜死亡在消化系统肿瘤中的调控网络与治疗潜力[J].中山大学学报(医学科学版),2025,46(2):230-237.
- [13] 陈亮.铜稳态失衡与铜死亡在疾病中的作用[J].Signal Transduct Target Ther,2022,7(1):378.
- [14] Ge EJ,et al.Connecting copper and cancer:from transition metal signalling to metalloplasia[J].Nat Rev Cancer,2022,22(2):102-113.
- [15] Xie J,et al.Cuproptosis:mechanisms and links with cancers[J].Mol Cancer,2023,22(1):46.