

雷公藤红素调控 FDX1/DLAT 通路诱导肝癌细胞铜死亡

林 然, 赵小惠, 刘 燕, 赵 珺*

青海大学 医学院 病原生物学与免疫学教研室, 青海 西宁 810016

摘 要: **目的** 探讨雷公藤红素调控肝癌细胞死亡的分子机制。**方法** 以人源肝癌细胞 HepG2、鼠源肝癌细胞 H22 为实验对象, 采用 CCK-8 法筛选出合适的药物浓度; 运用 EdU 实验、流式细胞术、细胞划痕实验分别检测雷公藤红素对肝癌细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响; 通过比色法检测细胞内 Cu^{2+} 浓度、荧光探针法检测线粒体膜电位 (JC-1) 的变化评估铜死亡的发生情况; 采用免疫印迹法检测细胞中铜代谢调节蛋白铁氧还蛋白 1 (FDX1) 和二氢硫辛酰胺转乙酰基酶 (DLAT) 的表达水平。**结果** 经不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后, 2 种肝癌细胞 (HepG2、H22) 和 2 种正常肝细胞 (LO2、AML12) 的活力均显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。在有效浓度范围内, 雷公藤红素 (0.5 、 2.5 、 $8.0 \mu\text{mol/L}$) 可显著抑制肝癌细胞增殖、促进肝癌细胞凋亡、降低肝癌细胞迁移能力 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且均呈一定的浓度相关性。雷公藤红素能够打破肝癌细胞内的铜代谢平衡, 上调胞内 Cu^{2+} 水平并引发 Cu^{2+} 蓄积 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且呈一定的浓度相关性。为维持铜代谢平衡而代偿性上调表达的 FDX1、DLAT 并未能扭转铜代谢失衡, 反而促使胞内毒性 Cu^+ 累积, 导致线粒体膜电位降低、线粒体功能损伤, 最终导致 FDX1、DLAT 蛋白表达损伤性下调, 引起细胞死亡。加入铜离子螯合剂 TTM 后, 雷公藤红素诱导的胞内 Cu^{2+} 蓄积可被逆转, FDX1、DLAT 异常表达被阻断, 肝癌细胞活力回升 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 在体外肝癌细胞模型中, 雷公藤红素通过破坏肝癌细胞内铜代谢稳态, 调控下游 FDX1/DLAT 表达, 进而诱导肝癌细胞发生铜死亡。

关键词: 雷公藤红素; 肝癌; 铜死亡; 铁氧还蛋白 1; 二氢硫辛酰胺转乙酰基酶

中图分类号: R286.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2026)09-2485-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.09.003

Celastrol induces cuproptosis in hepatoma cells by regulating FDX1/DLAT pathway

LIN Ran, ZHAO Xiaohui, LIU Yan, ZHAO Jun

Department of Pathogen Biology and Immunology, Medical College of Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism by which celastrol induces cuproptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and mice hepatocellular carcinoma cell line H22 were used as experimental models. The CCK-8 assay was employed to screen for appropriate drug concentrations for subsequent experiments. EdU proliferation assay, flow cytometry, and wound healing assay were used to evaluate the effects of celastrol on HCC cell proliferation, apoptosis, and migration, respectively. Cuproptosis was assessed by measuring intracellular Cu^{2+} concentration via colorimetric assay and detecting changes in mitochondrial membrane potential by JC-1 fluorescence probe assay. The expression levels of copper metabolism regulatory proteins FDX1 and DLAT were determined by Western blotting. **Results** After being treated with different concentrations of celastrol for 24 h, the viability of both liver cancer cells (HepG2, H22) and normal liver cells (LO2, AML12) significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001). Within the effective concentration range, celastrol could significantly inhibit the proliferation of liver cancer cells, promote their apoptosis, and reduce their migration ability ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), and all of these showed a certain concentration correlation. Celastrol (0.5 , 2.5 , $8.0 \mu\text{mol/L}$) could disrupt the copper metabolism balance within liver cancer cells, upregulate the intracellular Cu^{2+} level and trigger Cu^{2+} accumulation ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), and also showed a certain concentration correlation. To maintain the copper metabolism balance, the compensatory upregulation of FDX1 and DLAT expression failed to reverse the copper imbalance, instead promoting the intracellular accumulation of toxic Cu^+ , resulting in a decrease in

收稿日期: 2026-05-19

基金项目: 青海省 2022 年“高端创新人才千人计划”项目 (k9923195)

作者简介: 林 然, 女, 硕士研究生, 从事肿瘤免疫学研究。E-mail: 1587079741@qq.com

*通信作者: 赵 珺, 女, 博士, 从事肿瘤免疫学研究。E-mail: zhaojb2008@163.com/ 2010980008@qhu.edu.cn

mitochondrial membrane potential, mitochondrial dysfunction, and ultimately causing the damaging downregulation of FDX1 and DLAT protein expression, leading to cell death. After adding the copper ion chelator TTM, the intracellular Cu^{2+} accumulation induced by celastrol could be reversed, the abnormal expression of FDX1 and DLAT was blocked, and the viability of liver cancer cells recovered ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** In an *in vitro* HCC cell model, celastrol disrupts intracellular copper homeostasis in HCC cells, modulates the downstream expression of FDX1/DLAT, and further induces cuproptosis.

Key words: celastrol; hepatocellular carcinoma; cuproptosis; FDX1; DLAT

原发性肝癌是全球范围内发病率和死亡率均居高不下的恶性肿瘤之一，同时也是全球致死率排名第二的恶性肿瘤，其中肝细胞癌占肝癌总发病类型的 75% 以上^[1]。在中国，1990—2019 年的流调数据表明，肝癌死亡率高达 1.42~1.91 万^[2]。原发性肝癌整体预后情况不佳，患者生存率普遍偏低，严重降低患者长期生存质量，故寻找高效、低毒的抗肿瘤药物及新的治疗靶点是当前肝癌研究的核心内容^[3]。

肝脏是机体铜离子代谢、储存及转运的核心靶器官，调控着全身铜离子摄取、分配、利用与排泄的全过程，从而维持机体的铜离子平衡。这一独特的代谢定位，使得肝细胞对铜离子浓度变化高敏感，同时肝癌肿瘤微环境的调控高度依赖于铜离子的作用^[4]。在生理情况下肝细胞通过转运蛋白摄取铜离子，并借助伴侣蛋白完成铜的转运、利用、储存，再将多余的铜离子经胆汁排出。当铜离子代谢失衡、蓄积过量时，就会引起氧化应激、线粒体损伤，最终诱导细胞铜死亡^[5]。故铜离子过载是铜死亡发生的始动因素，铜离子过量导致线粒体膜电位下降，线粒体功能障碍，最终导致细胞死亡。核心特征是铜离子可与线粒体呼吸链中三羧酸循环的脂酰化组分结合，诱发脂酰化蛋白异常积聚、Fe-S 簇蛋白表达下调，进而触发蛋白毒性应激，最终导致细胞死亡^[6-7]。随着铜死亡机制逐渐明确，其在恶性肿瘤治疗中的作用备受关注。

研究表明，二氢硫辛酰胺转乙酰基酶（DLAT）作为丙酮酸脱氢酶复合体（PDC）的核心组分，扮演着“乙酰基转移酶”的角色。它接受活性乙酰基团后将基团传递给辅酶 A（CoA），最终生成乙酰辅酶 A，进而促进三羧酸循环，帮助完成细胞能量代谢的过程。线粒体上的铁氧还蛋白 1（FDX1）可以将 Cu^{2+} 还原为具有高毒性的 Cu^+ ，同时可以调控 DLAT 的脂酰化（硫辛酰化）修饰^[8]。当细胞内 Cu^{2+} 过量，FDX1 便将其还原为高毒性 Cu^+ ，毒性 Cu^+ 与脂酰化 DLAT 蛋白结合，直接导致 DLAT 蛋白结构异常、发生聚集（二聚化/寡聚化）^[6]，形成具有细

胞毒性的不溶性蛋白聚集体，进而引发线粒体代谢紊乱、三羧酸循环受阻以及 Fe-S 簇蛋白降解，最终导致细胞“铜死亡”。因此，FDX1/DLAT 轴是铜死亡发生的分子核心。

雷公藤红素是从卫矛科植物雷公藤中提取的天然五环三萜类化合物，具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性，近年来研究发现其对多种肿瘤细胞具有显著的抑制作用^[9]。现有肝癌研究显示，雷公藤红素可调控谷胱甘肽 S-转移酶 M1（GSTM1）表达诱导铁死亡并通过 eIF2 α /ATF4 轴激活 GSDME 介导的细胞焦亡^[10-11]，从而通过多种机制发挥抗肿瘤作用。本研究以人源和鼠源肝癌细胞为研究对象，通过细胞实验验证雷公藤红素可以通过调控铜代谢来诱导肝癌细胞死亡，为雷公藤红素在肝癌治疗中的应用提供了实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人源肝癌细胞 HepG2 及人源正常肝细胞 LO2 购自中国科学院细胞库；鼠源肝癌细胞 H22 购自武汉普诺赛生命科技有限公司；鼠源正常肝细胞 AML12 购自武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 雷公藤红素（质量分数 99.68%，批号 365703）、铜离子螯合剂四硫代钼酸铵（TTM，质量分数 99.99%，批号 672182）均购自 MedChemExpress 公司；CCK-8 试剂盒（批号 W0058DXR0106）、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（批号 AK21271）、 Cu^{2+} 检测试剂盒（批号 WU06V622H1245）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；线粒体膜电位（JC-1）检测试剂盒（武汉塞维尔生物科技有限公司，批号 MPC2601010）；EdU 细胞增殖检测试剂盒（批号 A059C250210）、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（批号 Z968241105）购自碧云天生物技术有限公司；FDX1 抗体（批号 00164600）、DLAT 抗体（批号 23014758）、 β -肌动蛋白（ β -actin）内参抗体（批号 2302194）购自武汉三鹰生物技术有限公司；细胞培养用 DMEM 培养基和 RPMI 1640 培养基、胎牛血清（FBS）、胰酶均

购自南京维森特生物技术有限公司。SpectraMax Paradigm 酶标仪 (Molecular Devices); ECLIPSE Ts2 倒置生物显微镜 (Nikon); ECLIPSE Ti2-E 倒置荧光显微镜 (Nikon); BG-gdsAUTO730 全自动凝胶成像系统 (北京百晶生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 4 种细胞均采用含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基或 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 定期更换培养基, 待细胞生长至对数期时进行传代或实验处理。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力及药物浓度筛选 取对数期生长的细胞, 胰酶消化后制成单细胞悬液, 以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 使细胞贴壁。随后加入不同浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 的雷公藤红素, 同时设置空白组 (仅加培养基, 不加细胞) 和对照组 (仅加细胞, 不加药)。继续培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 37 °C 孵育 1 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。结合药物对肝癌细胞抑制效果及对正常肝细胞的毒性, 筛选给药浓度开展后续实验。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.3 EdU 实验检测细胞增殖能力 取对数生长期细胞, 以 1×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 培养 12 h 后, 加入筛选出的适宜浓度 [对照 (0)、0.5、2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$] 雷公藤红素, 继续培养 24 h。按照 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书进行后续操作, 将处理好的细胞置于荧光显微镜下拍照, 按照公式计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = \text{EdU 标记的细胞总数} / \text{DAPI 染色的细胞总数}$$

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况 取对数生长期细胞, 以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 培养 12 h 后, 加入适宜浓度雷公藤红素, 分组与给药同 1.2.3 项下, 继续培养 24 h。胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心后, 加入 FITC 和 PI 染色液, 避光孵育 15 min, 立即使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 取对数期 HepG2 细胞 (H22 细胞为悬浮型肝癌细胞, 无法进行贴壁划痕实验, 因此迁移实验仅采用人源性细胞开展) 接种于 6 孔板中, 培养至细胞铺满 85%~

90% 后, 以无血清培养基替换原培养基, 饥饿培养 12 h。采用无菌 200 μL 枪头在细胞单层表面划出划痕, PBS 洗涤 3 次, 去除划掉的细胞和细胞碎片, 加入含适宜浓度雷公藤红素的培养基, 分组与给药同 1.2.3 项下, 置于培养箱中继续培养。分别在划痕后 0、24、36、48 h 时, 于倒置显微镜下观察并拍照, 计算细胞愈合率。

$$\text{愈合率} = (\text{0 h 划痕宽度} - \text{24 h/36 h/48 h 划痕宽度}) / \text{0 h 划痕宽度}$$

1.2.6 细胞内 Cu²⁺ 浓度、JC-1 检测 细胞经适宜浓度雷公藤红素处理 24 h 后, 分组与给药同 1.2.3 项下, 收集细胞, 按照 Cu²⁺ 检测试剂盒说明书操作, 测定各样本 A 值, 根据标准曲线计算细胞内 Cu²⁺ 浓度。取同样处理后的细胞, 按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒说明书进行后续操作, 通过荧光显微镜拍照, 计算细胞线粒体膜电位。

$$\text{线粒体膜电位} = \text{红色荧光强度} / \text{绿色荧光强度}$$

1.2.7 Western blotting 检测 FDX1、DLAT 蛋白表达 细胞经适宜浓度雷公藤红素处理 24 h 后, 分组与给药同 1.2.3 项下, 弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 超声破碎细胞后, 离心收集上清液即为总蛋白提取液。采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 调整各样本蛋白浓度一致后, 加入上样缓冲液并煮沸变性。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离不同分子量的蛋白, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入一抗 (FDX1 抗体、DLAT 抗体、 β -actin 抗体), 4 °C 孵育过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后, ECL 化学发光显色, Western blotting 成像系统拍照, 后使用 Image J 软件定量分析各蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算 FDX1、DLAT 蛋白相对表达量。

1.2.8 铜离子螯合剂 (TTM) 干预实验 取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中, 培养 12 h 后分为雷公藤红素 [对照 (0)、0.5、2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$] 组、雷公藤红素 + TTM 组, 继续培养 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞活力。

取对数期的细胞接种于 6 孔板中, 培养 12 h 后, 加入含 TTM 的适宜浓度雷公藤红素的培养基, 分组与给药同上, 继续培养 24 h 后提取总蛋白, 采用 Western blotting 检测细胞中 FDX1、DLAT 蛋白表达水平。

1.2.9 统计学处理 所有实验数据均采用 Prism 10 统计软件进行分析, 各组实验独立重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据比较采用单因素方差分析, 双变量交互作用分析采用双因素方差分析。

2 结果

2.1 雷公藤红素对肝细胞活力的影响

经不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后, 2 种肝癌

细胞 (HepG2、H22) 和 2 种正常肝细胞 (LO2、AML12) 的活力均显著下降 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈现一定的浓度相关性, 见图 1。综合考虑药物对肝癌细胞的抑制效果和对正常肝细胞活力的影响, 最终确定对肿瘤细胞抑制作用显著而对正常肝细胞活力影响小于 50% 的 0.5、2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验浓度。

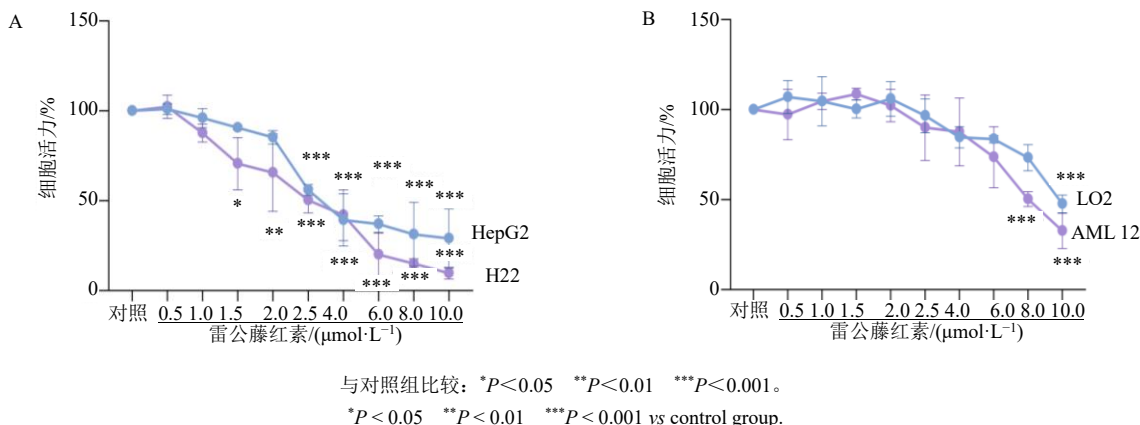


图 1 不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后对肝癌细胞 (A) 和正常肝细胞 (B) 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of different concentrations of celastrol treatment for 24 h on the viability of liver cancer cells (A) and normal liver cells (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.2 雷公藤红素对肝细胞增殖的影响

EdU 实验结果显示, 与对照组相比, 不同浓度雷公藤红素干预后 HepG2 细胞后的增殖率均显著降低, 雷公藤红素 2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 H22 细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且均呈一定的浓度相关性, 见图 2。

2.3 雷公藤红素对肝细胞凋亡的影响

流式细胞术检测发现, 与对照组相比较, 雷公藤红素 2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2、H22 细胞凋亡率显著上升 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且均呈一定的浓度相关性, 见图 3。

2.4 雷公藤红素对肝细胞迁移的影响

通过细胞划痕实验发现, 在 24、36、48 h 作用时间条件下, 雷公藤红素 2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2 细胞划痕愈合率均显著降低 ($P < 0.01, 0.001$), 呈现一定浓度相关性; 雷公藤红素 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 36 h 作用时间条件下细胞划痕愈合率显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。在相同药物浓度条件下, 对 HepG2 细胞迁移的抑制效应随作用时间变长而减弱 ($P < 0.05, 0.001$), 见图 4。

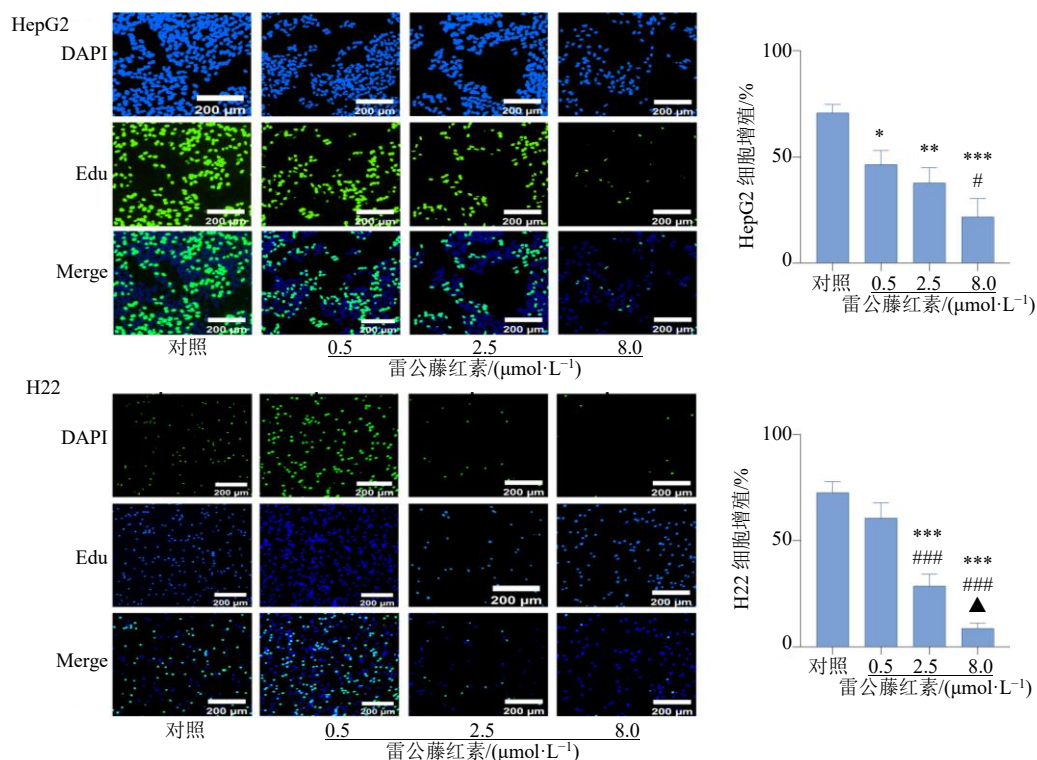
2.5 雷公藤红素对肝细胞内 Cu^{2+} 浓度、细胞线粒体膜电位的影响

与对照组相比, 雷公藤红素 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理

HepG2 细胞后, 细胞内 Cu^{2+} 含量显著增加 ($P < 0.01, 0.001$); 雷公藤红素 2.5、8.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理 H22 细胞后, 细胞内 Cu^{2+} 含量显著增加 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈一定的浓度相关性, 见图 5。雷公藤红素各浓度组线粒体膜电位均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且呈一定的浓度相关性, 见图 6。说明雷公藤红素可通过介导肝癌细胞发生铜离子蓄积而破坏线粒体膜电位、扰乱线粒体正常功能, 发挥肿瘤杀伤作用。

2.6 雷公藤红素通过 Cu^{2+} -FDX1-DLAT 轴调控对肿瘤细胞死亡的影响

细胞处理 24 h 后, 雷公藤红素 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组对 HepG2 细胞中 FDX1、DLAT 蛋白表达量显著降低; 雷公藤红素 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组对 H22 细胞中 FDX1 及雷公藤红素 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 H22 细胞中 DLAT 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 7。DLAT 蛋白表达量均表现为先上调后下调的情况, 结合上文雷公藤红素浓度越高, 肝癌细胞内 Cu^{2+} 浓度越高的结果, 认为雷公藤红素作用后, 当细胞内 Cu^{2+} 浓度尚未达到阈值时, 线粒体可能发生一定的代偿作用来维持正常的线粒体功能, 因此早期表现为 FDX1、DLAT 蛋白的增高。但当细胞内 Cu^{2+} 浓度超过某个阈值后, FDX1 还原 Cu^{2+} 成为 Cu^{+} 的线粒体功能受

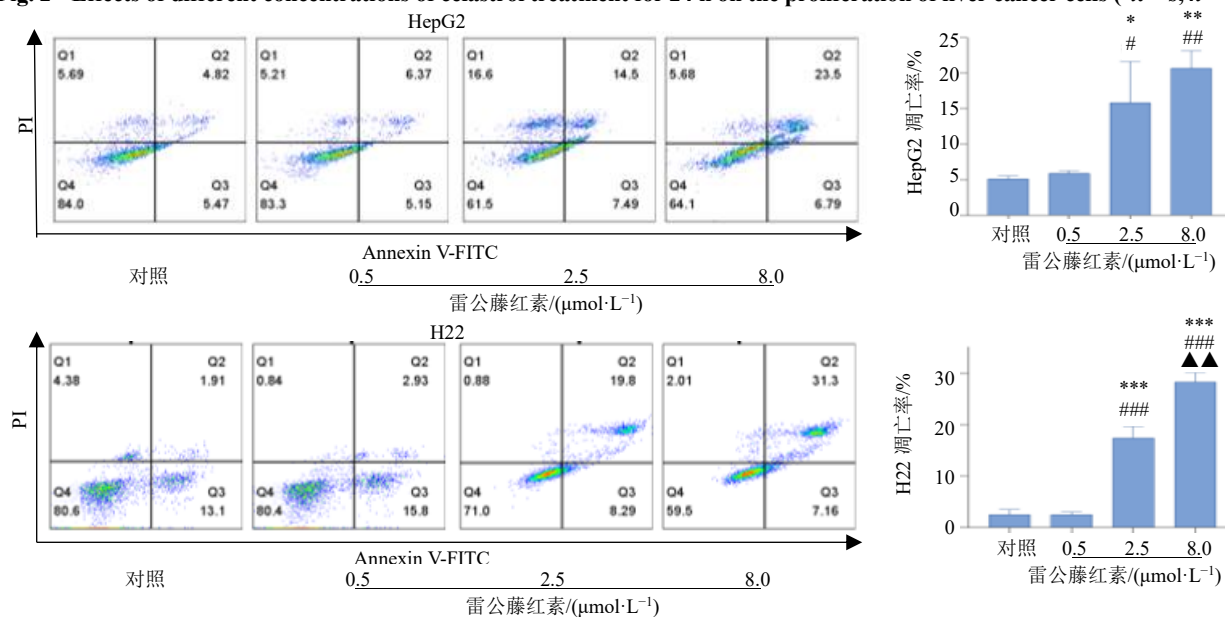


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs celastrol $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.05$ vs celastrol $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图 2 不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后对肝癌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of celastrol treatment for 24 h on the proliferation of liver cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

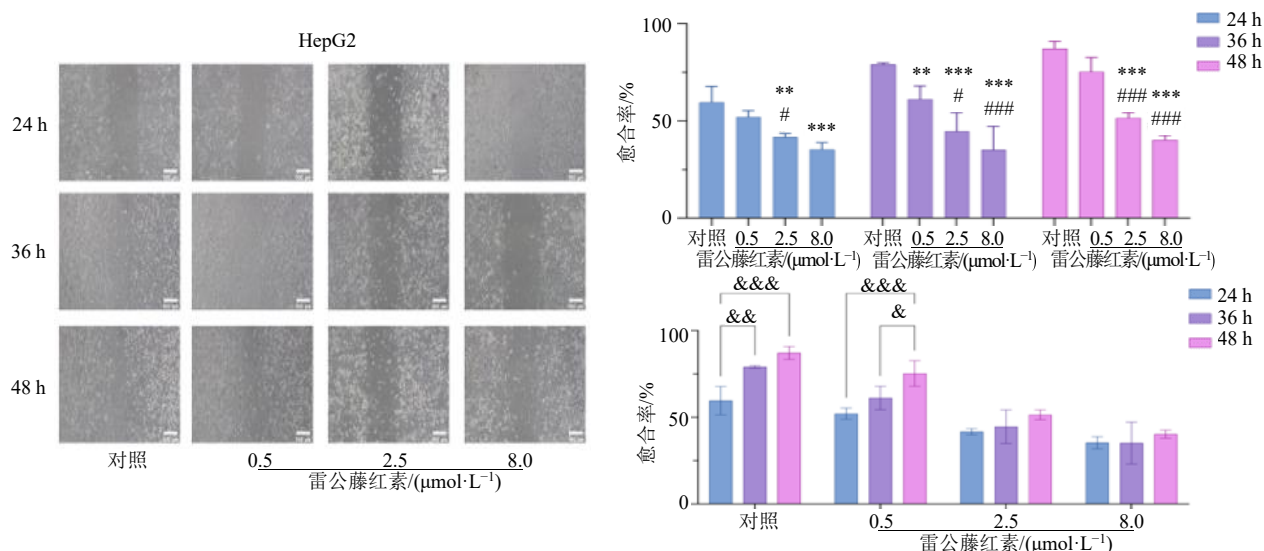


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs celastrol $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.01$ vs celastrol $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图 3 不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后对肝癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of celastrol treatment for 24 h on apoptosis of liver cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

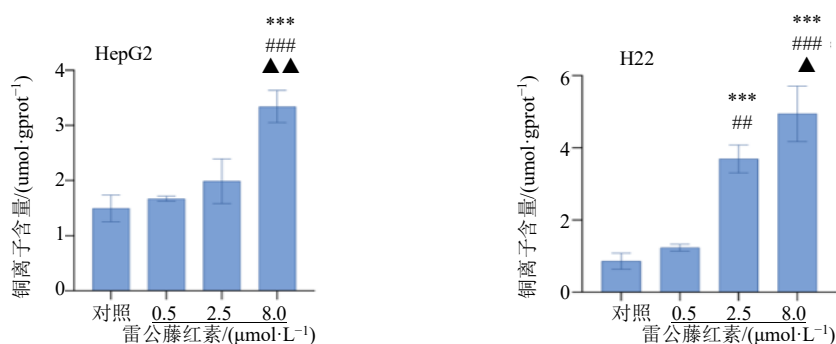


与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。与作用 24 h 组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ &&& $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs celastrol $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ &&& $P < 0.001$ vs 24-hour effect group.

图 4 不同浓度雷公藤红素处理后对肝癌细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of different concentrations of celastrol on the migration of liver cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与雷公藤红素 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs celastrol $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs celastrol $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图 5 不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后对细胞铜离子浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of different concentrations of celastrol treatment for 24 h on the copper ion concentration in cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

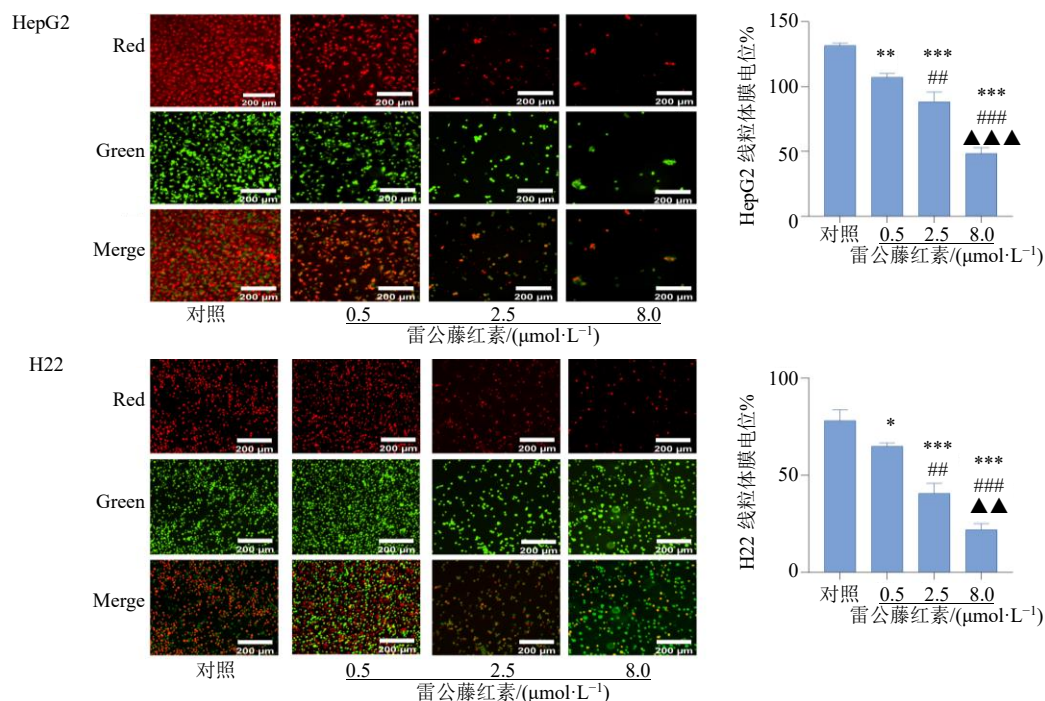
损, 进而表现为 FDX1、DLAT 蛋白的表达降低。

为了明确 FDX1 和 DLAT 这种变化趋势与铜离子代谢的相关性, 本研究选择使用铜离子螯合剂 TTM 进行进一步验证。结果显示, 相较于单纯雷公藤红素给药组, 雷公藤红素 (2.5 、 $8.0 \mu\text{mol/L}$) + TTM 组的 HepG2、H22 细胞活力显著回升 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 8。说明 TTM 干预后可以阻断雷公藤红素的杀肿瘤作用。结合铜离子螯合剂 TTM 通过与细胞内的 Cu^{2+} 高亲和力结合, 减少细胞内游离铜离子含量, 从而抑制细胞铜死亡的作用机制。

Western blotting 结果显示, TTM 干预后, 雷公藤红素诱导肿瘤细胞 FDX1、DLAT 蛋白先上调后下降的变化趋势消失, 也就证明雷公藤红素通过调节肿瘤细胞内铜离子, 进而影响细胞线粒体 FDX1、DLAT 蛋白表达, 导致线粒体功能失常, 最终诱导肿瘤细胞死亡。进一步证实雷公藤红素诱导肝癌细胞死亡的方式为铜死亡, 且依赖于 Cu^{2+} -FDX1-DLAT 轴的调控, 见图 9。

3 讨论

铜死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式, 其

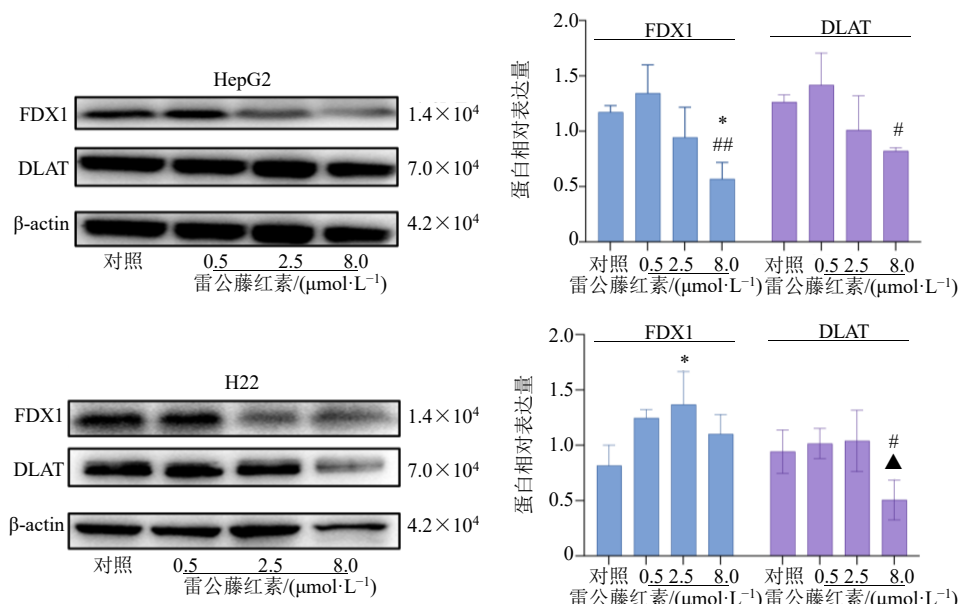


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与雷公藤红素 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与雷公藤红素 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲▲ $P < 0.01$ ▲▲▲ $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs celastrol 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; ▲▲ $P < 0.01$ ▲▲▲ $P < 0.001$ vs celastrol 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图 6 不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后对肝癌细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of celastrol on mitochondrial membrane potential of hepatoma cells after 24 h treatment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

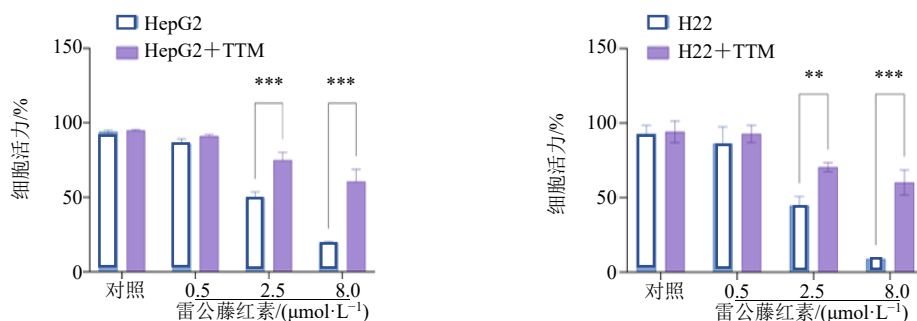


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与雷公藤红素 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与雷公藤红素 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs celastrol 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group; ▲ $P < 0.05$ vs celastrol 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

图 7 不同浓度雷公藤红素处理 24 h 后对肝癌细胞 FDX1 及 DLAT 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effects of different concentrations of celastrol treatment for 24 h on the protein levels of FDX1 and DLAT in liver cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与 HepG2/H22 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs HepG2/H22 group.

图 8 TTM 干预后不同浓度雷公藤红素处理 24 h 细胞活力的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Changes in cell viability after 24 hours of treatment with different concentrations of celastrol following TTM intervention ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

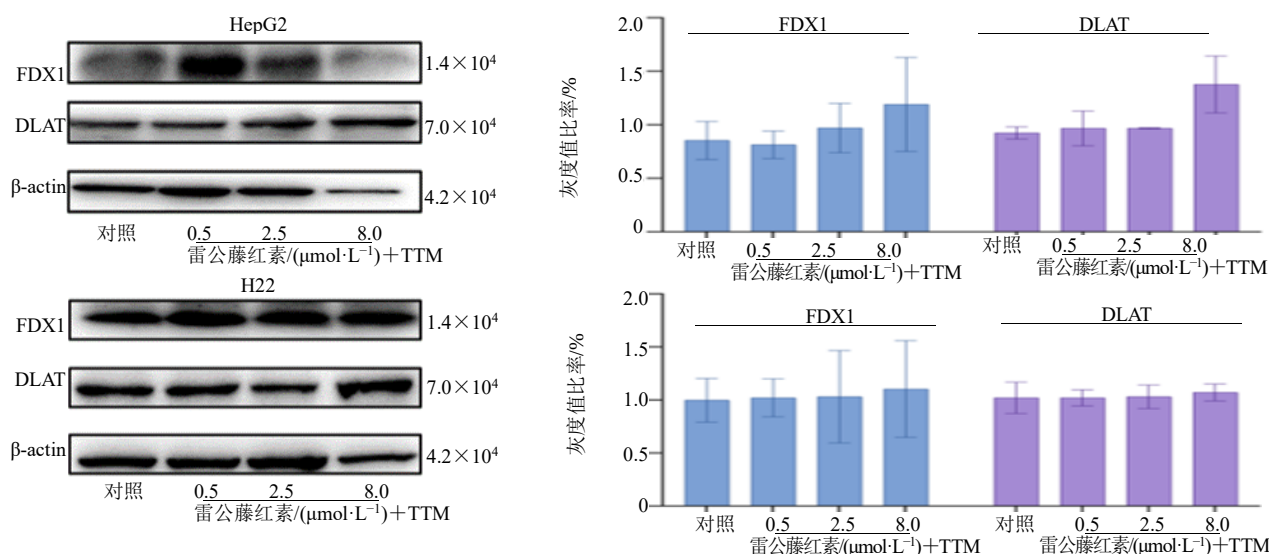


图 9 TTM 干预后不同浓度雷公藤红素处理 24 h 肝癌细胞 FDX1 及 DLAT 蛋白水平的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Changes in the protein levels of FDX1 and DLAT in liver cancer cells after 24 h of treatment with different concentrations of celastrol and TTM intervention ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

核心机制是铜离子过载诱导线粒体功能障碍和蛋白毒性应激,与肿瘤的发生发展密切相关。近年来铜死亡已成为肿瘤治疗的新靶点,铜离子载体类药物作为铜死亡诱导剂已在抗肿瘤研究中展现出良好前景^[12],而天然化合物诱导肿瘤细胞铜死亡的相关研究仍有待深入。有报道介绍雷公藤红素具有抗癌活性^[13],且已被证实雷公藤红素对多种肿瘤细胞具有显著抑制作用。本研究发现雷公藤红素可以抑制肝癌细胞的增殖与迁移、促进肝癌细胞凋亡,这与雷公藤红素具有多靶点、非特异性地干扰细胞周期、激活凋亡通路及影响细胞骨架功能的特征有关。结合本实验中观察到雷公藤红素作用呈现一定的浓度相关性。

关于铜稳态相关的研究表明维持铜稳态可有效保护正常肝细胞:如硫酸铜可恢复代谢相关脂质性肝病模型中的肝脏铜水平,进而减少脂质沉积、改善肝功能、缓解氧化应激并抑制细胞凋亡^[14];而绿茶提取物则通过促进铜离子经尿液与粪便排出,降低肝、脑、肾等组织的铜蓄积,从而减轻氧化损伤、维持肝功能稳定^[15],由此可见铜离子代谢调控也是肝脏保护的另—重要机制。本研究中发现雷公藤红素作用后肿瘤细胞铜离子代谢发生明显增高。在机制探究中发现雷公藤红素通过诱导铜离子过载、破坏线粒体功能及调节 FDX1、DLAT 表达,来触发肝癌细胞的铜死亡。结合现有报道的雷公藤红素可通过激活沉默信息调节因子 1 (SIRT1)/腺苷

酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路, 缓解肝细胞氧化应激并抑制炎症损伤, 改善内质网应激状态、纠正脂质代谢紊乱并减少脂肪异常沉积, 从而实现正常肝细胞的保护效应^[16-17]。说明雷公藤红素可能发挥双重作用。一方面, 通过调节铜代谢维持正常肝细胞内的铜离子生理平衡, 避免铜过载引发的氧化损伤; 另一方面, 则增加肝癌细胞内的铜离子蓄积, 诱导铜死亡发生, 破坏线粒体功能及能量代谢, 进而选择性杀伤肝癌细胞。这一双重效应为其可作为通过调节铜离子代谢而发挥抗肿瘤作用的备选成分提供了重要依据, 也充分证明雷公藤红素的作用呈现明显的量效关系这一结论是正确的。

结合实验结果可知, 雷公藤红素可以使肝癌细胞内 FDX1 与 DLAT 蛋白表达呈现先上调后下调的动态变化, 推测该现象是由胞内铜离子蓄积、通路负反馈调节、蛋白聚集介导的降解以及线粒体结构破坏等多重因素共同介导的应答过程。在细胞代偿阶段, 随着胞内铜离子不断蓄积, 细胞启动线粒体应激反应, 可能涉及 MTF1 等金属应激相关转录信号, 诱导 FDX1 表达代偿性上调; 此时 FDX1 的生物学功能发生转变, 作为含 Fe-S 簇的铁氧还蛋白, FDX1 一方面将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , 另一方面作为 LIAS 的电子供体维持下游蛋白的硫辛酰化修饰, 使细胞对铜的敏感性升高。进入细胞损伤阶段后, 大量生成的 Cu^+ 可攻击并破坏 Fe-S 簇结构, 可能导致 FDX1 发生去辅基、构象失稳并被加速降解; 同时高水平铜离子可激活 Akt1 信号通路, 促使 FDX1 在 Ser63 位点发生磷酸化修饰而丧失生物学活性, 叠加线粒体结构崩溃引发的蛋白非特异性降解以及细胞整体转录、翻译过程受抑, 最终造成 FDX1 蛋白表达水平与功能活性显著下降^[9, 18-19]。对于 DLAT 而言, 在细胞代偿阶段, 受 FDX1 调控, DLAT 的硫辛酰化修饰水平代偿性升高, 线粒体三羧酸循环功能出现短暂代偿; 而进入细胞损伤阶段, Cu^+ 直接结合硫辛酰化修饰的 DLAT, 诱导其组装形成不可溶的超大分子寡聚体, 使得细胞内具有功能活性的可溶性 DLAT 蛋白含量大幅降低。DLAT 异常聚集诱发蛋白质毒性应激, 泛素-蛋白酶体系统与自噬-溶酶体通路虽被动员, 但其清除能力不足以抵消聚集的生成, 蛋白毒性应激持续加剧^[5, 20-21]。上述 FDX1 功能失活与 DLAT 蛋白异常聚集降解级联事件相互协同, 共同参与并推动铜死亡的发生发展。

需要特别说明的是, 在反向验证实验中使用到

的 TTM 除了通过螯合铜离子抑制铜死亡表型以外, 还可通过抑制核因子- κB (NF- κB) 通路发挥抗血管生成、调控炎症及纤维化等多重药理效应^[22]。本研究使用的体外肝癌细胞模型, 无法模拟体内肿瘤微环境内炎症反应、血管生成等复杂生物学过程。基于此, 若将 TTM 用于体内实验时会存在作用靶点混杂的局限, 实验结果易受到 NF- κB 等其他信号通路的干扰, 给机制解析带来不确定性。TTM 除螯合铜离子之外的上述多重效应对肿瘤生物学行为的影响, 以及这些效应与其对肿瘤细胞铜代谢影响之间的相互作用还需要进一步通过动物模型深入探究, 这也是我们后续将继续探究的内容之一。

总之, 本研究采用人源和鼠源两种肝癌细胞进行平行实验, 在细胞水平证明了雷公藤红素的作用特点, 同时不同种属来源的细胞实验结果一致性也证明了结论的可靠性。但当前的研究局限于细胞水平, 需要进一步在动物模型中验证雷公藤红素的抗肿瘤作用, 验证其量效关系和作用机制, 以期为肝癌临床治疗提供新的思路与实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] McGlynn K A, Petrick J L, El-Serag H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2021, 73(Suppl 1): 4-13.
- [2] 国家卫生健康委疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告(2020 年) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022: 93.
- [3] Zhou Y, Wang Z, Ren S, *et al.* Mechanism of action of protopanaxadiol ginsenosides on hepatocellular carcinoma and network pharmacological analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 548-557.
- [4] Zhang R Y, Tan Y F, Xu K, *et al.* Cuproplasia and cuproptosis in hepatocellular carcinoma: Mechanisms, relationship and potential role in tumor microenvironment and treatment [J]. *Cancer Cell Int*, 2025, 25(1): 137.
- [5] Mao Y, Chen H, Zhu W, *et al.* Cuproptosis cell death molecular events and pathways to liver disease [J]. *J Inflamm Res*, 2025, 18: 883-894.
- [6] 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.
- [7] Lu S, Li Y, Yu Y. Glutathione-scavenging celastrol-Cu nanoparticles induce self-amplified cuproptosis for augmented cancer immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(35): e2404971.

- [8] Guo Z Y, Chen D Y, Yao L, *et al.* The molecular mechanism and therapeutic landscape of copper and cuproptosis in cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 149.
- [9] 温乐乐, 叶梓, 江丽洁, 等. 基于 CiteSpace 的雷公藤红素知识图谱分析 [J]. *中草药*, 2024, 55(11): 3789-3804.
- [10] Cai B L, Qi M M, Zhang X, *et al.* Integrating network pharmacology with *in vitro* experiments to validate the efficacy of celastrol against hepatocellular carcinoma through ferroptosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 3121-3141.
- [11] 李端, 王永辉, 周静, 等. 雷公藤红素通过调控 ATF4/caspase-3/GSDME 信号通路促进肝癌细胞焦亡[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(2): 299-307.
- [12] Xie C, Sun Q L, Chen J L, *et al.* Cu-Tremella fuciformis polysaccharide-based tumor microenvironment-responsive injectable gels for cuproptosis-based synergistic osteosarcoma therapy [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 270(Pt 2): 132029.
- [13] 刘飞, 黄树模. 雷公藤红素——一种钙调素拮抗剂 [J]. *现代应用药理学*, 1990(2): 39.
- [14] Xie W, Zhang Y, Sun F, *et al.* CuSO₄ protects hepatocytes from lipotoxicity by promoting autophagic degradation of lipid droplets to attenuate oxidative stress [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2025, 303: 118848.
- [15] Yang D L, Xuan S J, Zhang W, *et al.* Natural copper ion scavenger: Investigation of the hepatoprotective effects of green tea extract in toxic-milk mice with Wilson's disease model [J]. *Foods*, 2025, 14(4): 679.
- [16] 姜霞, 姜慧玲, 杨帆, 等. 雷公藤红素对非酒精性脂肪肝 L02 细胞内质网应激的影响及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(14): 99-105.
- [17] Zhang Y L, Geng C, Liu X Y, *et al.* Celastrol ameliorates liver metabolic damage caused by a high-fat diet through SIRT1 [J]. *Mol Metab*, 2016, 6(1):138-147.
- [18] Cong Y T, Li N, Zhang Z X, *et al.* Cuproptosis: Molecular mechanisms, cancer prognosis, and therapeutic applications [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 104.
- [19] Wang Y Q, Zhang L, Zhou F F. Cuproptosis: A new form of programmed cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(8): 867-868.
- [20] Zhang L G, Deng R T, Guo R Q, *et al.* Recent progress of methods for cuproptosis detection [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1460987.
- [21] Du J M, Wang X Y, Zeng Y R, *et al.* Tanshinone II_A induces oxidative stress in trophoblast cells and enhances copper dependent death [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 25012.
- [22] Brewer G J. Tetrathiomolybdate anticopper therapy for Wilson's disease inhibits angiogenesis, fibrosis and inflammation [J]. *J Cell Mol Med*, 2003, 7(1): 11-20.

[责任编辑 高源]