

基于 Keap1/Nrf2/ARE 通路和铜稳态研究珠子参总皂苷对伊利司莫和二水合氯化铜诱导肝细胞铜死亡的影响

张继红^{1,2}, 张艳丽², 李浩然², 石孟琼^{1*}, 闵泽婷³, 张颖⁴, 刘杰⁴, 何毓敏³, 潘朝旺⁵, 许杰², 周刚^{2*}

1. 三峡大学基础医学院, 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学中医医院&湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心, 湖北 宜昌 443002

3. 三峡大学健康医学院, 湖北 宜昌 443002

4. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

5. 鄂州职业大学医学院, 湖北 鄂州 436000

摘要:目的 基于 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant response elements, ARE) 通路和铜稳态研究珠子参总皂苷 (total saponins of *Panax japonicus*, TSPJ) 对伊利司莫和二水合氯化铜 (elesclomol-CuCl₂·2H₂O, Ele-Cu²⁺) 诱导的肝细胞铜死亡的影响。方法 设置对照组、模型组、TSPJ (25 μg/mL) 组、Nrf2 抑制剂 ML385 (10 μmol/L) 组和 TSPJ (25 μg/mL) + ML385 (10 μmol/L) 组。构建 Ele-Cu²⁺ 诱导的 AML-12 细胞铜死亡模型, 给予药物干预后, 采用 MTT 法检测细胞活力; 采用试剂盒检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放率及细胞中过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 水平; 采用 Sytox Green、DCFH-DA、JC-1、R6G 荧光探针分别检测细胞坏死性凋亡、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 和 Cu²⁺ 水平; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测细胞中 Keap1、Nrf2、谷氨酰半胱氨酸连接酶催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]、二氢硫辛酸乙酰转移酶 (dihydrolipoamide acetyltransferase, DLAT)、铁氧还蛋白 1 (ferredoxin 1, FDX1)、硫辛酸合酶 (lipoic acid synthase, LIAS)、热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶铜转运蛋白 7A (ATPase copper-transporting 7α, ATP7A)、ATP 酶铜转运蛋白 7B (ATPase copper-transporting 7β, ATP7B)、铜离子通道溶质载体家族 31 成员 1 (copper ion channels solute carrier family 31 member 1, SLC31A1)、抗氧化剂 1 铜伴侣蛋白 (antioxidant 1, ATOX1)、超氧化物歧化酶的铜伴侣蛋白 (copper chaperone for Sod1, CCS)、细胞色素 C 氧化酶铜伴侣蛋白 17 (cytochrome C oxidase 17, COX17) mRNA 和蛋白表达。结果 与模型组比较, TSPJ 组细胞存活率和 MMP 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 细胞坏死性凋亡率、LDH 释放率、ROS、Cu²⁺、MDA 水平和 MPO 活性显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), CAT、GSH、SOD、T-AOC 活性显著升高 ($P < 0.01$), Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1、FDX1、LIAS、DLAT、ATP7A、ATP7B、CCS、COX17 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Keap1、HSP90、SLC31A1、ATOX1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 而 ML385 能够显著抑制 TSPJ 对细胞铜死亡的改善作用 ($P < 0.01$)。结论 TSPJ 可能通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路, 调节铜稳态改善 Ele-Cu²⁺ 诱导的肝细胞铜死亡。

关键词: 珠子参总皂苷; 伊利司莫; 二水合氯化铜; 肝细胞; Keap1/Nrf2/ARE 信号通路; 铜稳态; 铜死亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)20-7422-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.20.014

收稿日期: 2025-07-01

基金项目: 湖北省科技厅重点研发项目 (2025BCB067); 湖北省科技厅重点研发大健康计划项目 (2022BCE017); 湖北省科技厅自然科学基金项目 (2022CFB357, 2022CFB427, 2023AFB600); 湖北省卫生健康委员会中医药重点项目 (ZY2023Z015); 湖北卫生健康委员会卫生健康科研项目 (WJ2023M153); 湖北省功能性消化系统疾病中医临床医学研究中心开放基金项目 (SXZ202303, SXZ202308, SXZ202311); 湖北省宜昌市科学技术局医疗卫生研究项目 (A23-1-061); 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室 2022 年度开放基金 (2022KZL2-11)

作者简介: 张继红 (1967—), 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病基础与临床研究。E-mail: 13872605766@163.com

***通信作者:** 石孟琼 (1971—), 高级实验师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: shm0212@126.com

周刚 (1973—), 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合防治消化系统疾病研究。E-mail: 13661880@qq.com

Effect of total saponins of *Panax japonicus* on elesclomol- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -induced cuproptosis in hepatocytes based on Keap-1/Nrf2/ARE signaling pathway and copper homeostasis

ZHANG Jihong^{1,2}, ZHANG Yanli², LI Haoran², SHI Mengqiong¹, MIN Zeting³, ZHANG Ying⁴, LIU Jie⁴, HE Yumin³, PAN Chaowang⁵, XU Jie², ZHOU Gang²

1. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Traditional Chinese Medicine Hospital of China Three Gorges University, Hubei Clinical Research Center for Functional Digestive Diseases of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443002, China

3. College of Medicine and Health Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

4. College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

5. Medical College, Ezhou Vocational University, Ezhou 436000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of total saponins of *Panax japonicus* (TSPJ) on cuproptosis induced by elesclomol- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ele- Cu^{2+}) in hepatocytes based on Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response elements (ARE) pathway and copper homeostasis. **Methods** Control group, model group, TSPJ (25 $\mu\text{g/mL}$) group, Nrf2 inhibitor ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) group and TSPJ (25 $\mu\text{g/mL}$) + ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) group were set up. Ele- Cu^{2+} -induced cuproptosis model in AML-12 cells was established. After drug intervention, cell viability was detected by MTT; The release rate of lactate dehydrogenase (LDH), as well as levels of catalase (CAT), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and total antioxidant capacity (T-AOC) in cells were detected by reagent kits; The levels of necrotic apoptosis, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP) and Cu^{2+} were respectively detected by Sytox Green, DCFH-DA, JC-1 and R6G fluorescent probes; The mRNA and protein expressions of Keap1, Nrf2, glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), dihydrolipoamide acetyltransferase (DLAT), ferredoxin 1 (FDX1), lipoic acid synthase (LIAS), heat shock protein 70 (HSP70), ATPase copper-transporting 7 α (ATP7A), ATPase copper-transporting 7 β (ATP7B), copper ion channels solute carrier family 31 member 1 (SLC31A1), antioxidant 1 (ATOX1), copper chaperone for Sod1 (CCS) and cytochrome C oxidase 17 (COX17) were detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** Compared with model group, survival rate and MMP level in TSPJ group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), the necrotic apoptosis rate, LDH release rate, levels of ROS, Cu^{2+} , MDA and activity of MPO were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), the levels of CAT, GSH, SOD and T-AOC were significantly increased ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of Nrf2, GCLC, HO-1, NQO1, FDX1, LIAS, DLAT, ATP7A, ATP7B, CCS, COX17 were significantly up-regulated ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of Keap1, HSP70, SLC31A1, ATOX1 were significantly down-regulated ($P < 0.01$). While ML385 could significantly inhibit the amelioration effect of TSPJ on cell cuproptosis ($P < 0.01$). **Conclusion** TSPJ may ameliorate Ele- Cu^{2+} -induced cuproptosis in hepatocytes by activating Keap1/Nrf2/ARE pathway and regulating copper homeostasis.

Key words: total saponins of *Panax japonicus*; elesclomol; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; hepatocytes; Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway; copper homeostasis; cuproptosis

肝脏是维持生物体生命活动不可或缺的器官，是合成代谢、分解代谢和能量代谢的主要场所^[1]。肝损伤是一种由于各种原因（如酒精、药物、中毒等）导致肝细胞生理功能出现异常的疾病，主要表现为肝脏脂肪堆积、肝组织坏死及纤维化等病理性改变^[2-3]。肝损伤早期症状较隐匿且不典型、容易被忽视，随着病情发展，肝组织逐渐失去正常功能，进而发展为肝纤维化和肝硬化，甚至恶化为肝癌^[4-6]。因此，探索肝损伤的发病机制，开展对肝损伤的防

治研究，寻找安全有效的治疗方法来预防其发生和发展至关重要。

铜是各种生理过程所必需的矿物质，在线粒体呼吸、抗氧化、铁吸收和解毒等生物过程和信号传导中发挥基础性作用^[7]。肝脏是铜在体内代谢的最重要器官，铜离子在生物体内保持稳态，铜离子不足或过剩都可能导致各种疾病，其中肝损伤为铜负荷的首要表现^[8]。Meram 等^[9]研究发现肝炎患者血清中铜浓度与正常人相比明显升高；Luo 等^[10]研究

发现,刀豆蛋白 A 能够诱导铜在小鼠肝脏积累,引起急性肝损伤,给予梅沙替尼治疗后促进了肝脏铜离子的分泌和运输,有效地缓解了急性肝损伤。上述研究表明,铜在肝脏积累诱发了肝损伤。铜是多种关键代谢酶的辅因子,这些代谢酶驱动着广泛的生理过程,如氧化还原稳态、线粒体能量代谢和细胞外基质重塑^[11]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是调节细胞氧化应激的重要转录因子,也是细胞内氧化还原稳态的核心调节因子^[12-13]。Nrf2 对体内铜稳态的调节至关重要。过量铜可以抑制白血病干细胞中 Nrf2、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 表达,在选择性根除白血病细胞中发挥作用^[14];氧化铜纳米粒子可以通过干扰泛素-蛋白酶体途径抑制 Nrf2 降解,从而发挥血管损伤抑制剂的作用^[15]。肝脏中铜含量受铜转运蛋白、铜伴侣和铜酶的调节,这对维持铜稳态、防止铜超载和抑制铜死亡非常重要^[8]。研究表明,可以通过调控铜稳态调节蛋白[三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶铜转运蛋白 7A (ATPase copper-transporting 7 α , ATP7A)、ATP 酶铜转运蛋白 7B (ATPase copper-transporting 7 β , ATP7B)、铜离子通道溶质载体家族 31 成员 1 (copper ion channels solute carrier family 31 member 1, SLC31A1)]以及铜伴侣蛋白[抗氧化剂 1 铜伴侣蛋白 (antioxidant 1, ATOX1)、超氧化物歧化酶的铜伴侣蛋白 (copper chaperone for Sod1, CCS)、细胞色素 C 氧化酶铜伴侣蛋白 17 (cytochrome C oxidase 17, COX17)]和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的表达来抑制铜死亡,从而缓解急性肝损伤^[10,16]。因此,研究肝脏铜死亡的机制是治疗铜死亡驱动肝损伤的有效策略。

珠子参总皂苷 (total saponins of *Panax japonicus*, TSPJ) 为五加科植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk) C. Y. Wu et K. M. Feng 的重要活性成分^[17]。课题组前期研究发现 TSPJ 可显著改善对乙酰氨基酚所致的肝损伤,抑制中性粒细胞浸润和巨噬细胞募集;TSPJ 可有效逆转四氯化碳所致的纤维化,降低胶原纤维面积比、网状纤维面积比、肝纤维化分级和羟脯氨酸含量,改善肝功能和组织形态学,证实 TSPJ 防治肝损伤、逆转肝硬化与其抗氧化、抑制肝细胞凋亡和炎症反应有关^[18-23]。上述研究表明 TSPJ 对药物性和化学

性肝损伤具有较好的保护作用,同时也证实调控细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/环氧合酶-2 信号通路、细胞色素 P450 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1) 和沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1)/过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferative activated receptor- γ activation of auxiliary factor-1 α , PGC-1 α)、Nrf2 信号通路及铁蛋白重链介导巨噬细胞的铁、铜代谢是其重要的作用机制^[18-24]。然而,TSPJ 对铜超载诱导肝细胞铜死亡的影响尚不清楚。基于此,本研究拟探讨 TSPJ 对伊利司莫、二水合氯化铜 (elesclomol- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Ele- Cu^{2+}) 诱导肝细胞铁死亡的影响,以及 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/Nrf2/ARE 通路和铜稳态在其中的调控作用,以期为中药治疗肝损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

小鼠 AML-12 肝细胞 (批号 24062119) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

TSPJ (批号 23082516, 质量分数为 92.65%) 由本课题组制备^[25];DMEM/F-12 培养基 (批号 C21702405BT)、1%胰岛素-转铁蛋白-硒添加剂 (insulin transferrin selenium additive, ITS-G, 批号 D856)、地塞米松 (dexamethasone, DEX, 批号 D391)、胎牛血清 (批号 SA190504)、MTT (批号 T8835)、四硫代钼酸铵 (ammonium tetrathiomolybdate, AMT, 批号 D3562)、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 检测试剂盒 (批号 T7526)、坏死性凋亡 (Sytox Green) 检测试剂盒 (批号 0MYL16)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 S0019) 购自美国 Invitrogen 公司;伊利司莫 (elesclomol, Ele, 批号 T6170) 购自美国 TopScience 公司; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+} , 批号 A603090-0250)、 Cu^{2+} 探针 (批号 HS12008010) 购自厦门赫利森生物科技有限公司;Nrf2 抑制剂 ML385 (批号 S8790) 购自美国 Selleck 公司;乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号 20241109)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20241127)、

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒(批号 20241116)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)试剂盒(批号 20241205)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 S8790)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号 20241029)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(批号 20241113)购自南京建成生物工程研究所; Keap1、Nrf2、抗氧化反应元件(antioxidant response elements, ARE)、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)、HO-1、NAD(P)H 醌氧化还原酶[NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]、二氢硫辛酸乙酰转移酶(dihydrolipoamide acetyltransferase, DLAT)、铁氧还蛋白 1(ferredoxin 1, FDX1)、硫辛酸合酶(lipoic acid synthase, LIAS)、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)、ATP7A、ATP7B、SLC31A1、ATOX1、CCS、COX17、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; DEPC 水(批号 20241206)、TRIzol(批号 12237897)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Prime Script™ RT reagent kit(批号 600532)、Taq DNA 聚合酶(批号 605679)购自宝生物工程(大连)有限公司; Keap1、总 Nrf2、细胞核 Nrf2、ARE、HO-1、NQO1、FDX1、LIAS、DLAT 单体、DLAT 寡聚体、HSP70、ATP7A、ATP7B、SLC31A1、ATOX1、CCS、COX17 和 β -actin 鼠源抗体(批号分别为 sc-07145、sc-37624、sc-37651、sc-33054S、sc-36520S、sc-36081S、sc-32164、sc-03627、sc-03271S、sc-36274、sc-29637、sc-30154、sc-35024、sc-33069、sc-43051、sc-34658、sc-31037、sc-49753)购自美国 CST 公司; HRP 标记的 IgG 抗体(批号 ab75229)购自英国 Abcam 公司; ECL 发光试剂盒(批号 P0128)、蛋白提取试剂盒(批号 P0069)购自南京碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

MA54 型电子天平[梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; VORTEX-6 型涡旋仪(美国 Aoran 公司); 5427R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); HVA-110 型高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司); MCO-18AIC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); MA200 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司);

BX43 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Infinite 200PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); FACS Aria II 型流式细胞仪(美国 BD 公司); Nano Drop One 型核酸测定仪(美国 Thermo 公司); CFX Opus 96 型实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); DYCZ-24A/B 型转膜电泳槽、DYCZ-20G 型电泳仪、DYCZ-40S 型垂直电泳槽(北京六一生物科技有限公司); Tanon MINI Space2000 型凝胶成像分析系统(上海天能生命科学有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

AML-12 细胞用含 10%胎牛血清、1% ITS-G、40 ng/mL DEX、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM-F12 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。隔天更换 1 次培养液, 待细胞生长至对数生长期时, 用胰酶消化细胞, 制成细胞悬液后, 接种于培养板中用于后续实验。

2.2 MTT 法检测 Ele、Cu²⁺对 AML-12 细胞活性的影响

AML-12 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 在细胞培养箱培养至 80%融合后, 设置 Ele(10、50、100 nmol/L)组、Cu²⁺(1、5、10 μ mol/L)组、Ele-Cu²⁺组(50 nmol/L Ele+1 μ mol/L Cu²⁺)、Ele-Cu²⁺+AMT 组(50 nmol/L Ele+1 μ mol/L Cu²⁺+20 μ mol/L AMT)以及对照组。除对照组不用药物处理、Ele-Cu²⁺+AMT 组先用 AMT(20 μ mol/L)处理细胞 1 h 外, 其他组加入相应浓度的药物, 分别培养 6、12、24 h, 取出 96 孔板, 于超净台中避光操作, 每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 放入培养箱继续培养 4 h 后, 用 200 μ L 移液枪吸尽培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 于微孔振荡板上 500 r/min 振荡 5 min, 采用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度(*A*)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 MTT 法检测 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞活性的影响

AML-12 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 在细胞培养箱培养至 80%融合后, 设置对照组、模型组和 TSPJ(3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 μ g/mL)组, 模型组和给药组在加入 50 nmol/L Ele、1 μ mol/L Cu²⁺后^[10,26-27], 再加入不同质量浓度的 TSPJ 继续培养 24 h, 对照组加入不含药物的培养基, 按照“2.2”项下方法测

定 A 值, 计算细胞存活率。

2.4 比色法检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞 LDH 释放率的影响

按照“2.3”项下方法进行分组和给药, 吸取上清液, 按照试剂盒说明书检测各组细胞的 LDH 释放率。

2.5 免疫荧光法检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致 AML-12 细胞坏死性凋亡的影响

AML-12 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中, 在细胞培养箱培养至 80%融合后, 设置对照组、模型组、TSPJ (25 $\mu\text{g/mL}$) 组、ML385 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组和 TSPJ+ML385 组 (25 $\mu\text{g/mL}$ TSPJ+10 $\mu\text{mol/L}$ ML385), 模型组和给药组在加入 50 nmol/L Ele、1 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 后, 再加入相应的药物继续培养 24 h, 对照组加入不含药物的培养基, 收集细胞, 按照 Sytox Green 试剂盒说明书检测各组细胞的坏死性凋亡水平^[28-29]。

2.6 免疫荧光法检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞线粒体膜电位和 ROS 水平的影响

AML-12 细胞以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 按照“2.5”项下方法进行细胞分组和给药, 收集细胞, 按照 MMP (JC-1 荧光探针) 和 ROS (DCFH-DA 荧光探针) 试剂盒说明书检测各组细胞 MMP 和细胞内 ROS 水平^[30]。

2.7 免疫荧光法检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞内 Cu^{2+} 水平的影响

AML-12 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中, 按照“2.5”项下方法进行细胞分组和给药, 收

集细胞, 按照试剂盒推荐的浓度加入 R6G 探针, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。染色后, 用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂密封细胞, 按照 Luo 等^[10]方法通过检测各组细胞中 R6G 荧光强度来反映 Cu^{2+} 水平。

2.8 试剂盒检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中内源性抗氧化酶活性的影响

按照“2.5”项下方法进行细胞分组和给药, 收集细胞, 经超声破碎仪破碎后细胞离心, 收集上清液, 按试剂盒说明书测定细胞中 CAT、GSH-Px、MPO、SOD、T-AOC 活性和 MDA 含量。

2.9 qRT-PCR 检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中 Keap1/Nrf2/ARE、铜死亡和铜稳态调节通路相关蛋白 mRNA 表达的影响

按照“2.5”项下方法进行细胞分组和给药, 收集细胞, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 使用 All-in-one RT Supermix 将 RNA 逆转录为 cDNA。采用核酸测定仪对 cDNA 进行定量, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行 Real-time PCR 反应, PCR 循环反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 延长 15 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 AML-12 细胞中 Keap1、Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1、FDX1、LIAS、DLAT、ATP7A、ATP7B、SLC31A1、ATOX1、CCS 和 COX17 mRNA 表达量, 引物序列见表 1。

2.10 Western blotting 检测 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中 Keap1/Nrf2/ARE、铜死亡和铜稳态调节相关蛋白表达的影响

按照“2.5”项下方法进行细胞分组和给药, 收

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')
<i>Keap1</i>	GATGGGCAGGACCAAGTTGAA	CCGAGGACGTAGATCTTGCC
<i>Nrf2</i>	ACCTCTGCTGCAAGTAGCCT	TGTCAATCAAATCCATGTCCTGC
<i>GCLC</i>	CAGTCAAGGACCGGCACAAG	CAAGAACATCGCCTCCATTTCAG
<i>HO-1</i>	CACTCTGGAGATGACACCTGAG	GTGTTCTCTGTGTCAGCATCACC
<i>NQO1</i>	ACGACAACGGTCCTTTCCAG	TCCTCCAGACGGTTTCCA
<i>HSP70</i>	CATCAGTGGGCTGTACCAGG	GAGGCTCCTTTCGGCGG
<i>FDX1</i>	TATCGATGGGTTTGGTGCGT	TCCAAAAGCCAGGTCAAGCA
<i>LIAS</i>	AAGCAATTGCAGAGTGGGGT	GACAGAGCCACCTCTCTCCAC
<i>DLAT</i>	CAGAGGCTCATGCGATCGAA	AGCAACACTGACGTCAACCA
<i>ATP7A</i>	GGGATGACCTGTGCTTCTTGTTAG	TTACTTCTGCCTTGCCAGCCATTAG
<i>ATP7B</i>	TGCTGATTGGAAACCGGGAA	GATGGCCGTCTGTCTTTTCA
<i>SLC31A1</i>	AACCACACGACGACAAACAT	CCAGCCATTCTCCAGGTGT
<i>ATOX1</i>	GTGGACATGACCTGTGAGGG	TGTGCTCAGAGTCGATGCAG
<i>CCS</i>	TCAGAGCTGTGTGGATGCTG	CCGTCGATGGTTCCCTCAAT
<i>COX17</i>	GAAGAAGCCACTGAAGCCCT	CCTCATGCACTCCTTGTGGGG
<i>GAPDH</i>	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA

集细胞,按照蛋白提取试剂盒说明书分别提取总蛋白、胞质和胞核蛋白。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后,依次孵育一抗和二抗,洗涤后,加入 ECL 化学发光试剂显影,检测 AML-12 细胞中 Keap1/Nrf2/ARE 通路相关蛋白 (Keap-1、总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1)、铜死亡相关蛋白 (FDX1、LIAS、DLAT 单体、DLAT 寡聚体、HSP70)、铜稳态相关蛋白 (ATP7A、ATP7B、SLC31A1、ATOX1、CCS、COX17) 的表达。

2.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析,采用 *T*-test 进行组间比较分析,单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间分析。

3 结果

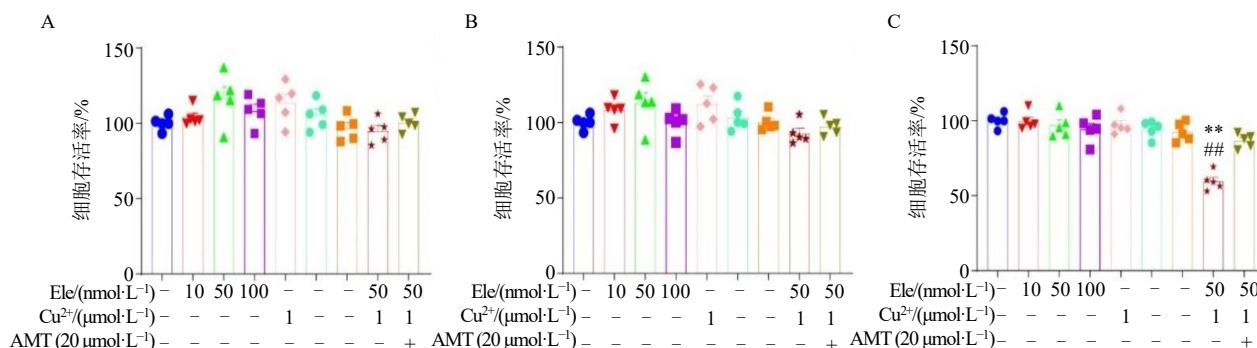
3.1 Ele-Cu²⁺对 AML-12 细胞存活率的影响

如图 1 所示,与对照组比较,Ele (10、50、100 nmol/L) 或 Cu²⁺ (1、5、10 μmol/L) 分别处理 AML-12 细胞 6、12、24 h 后,细胞存活率无明显变化;

加入 Ele-Cu²⁺ (50 nmol/L Ele+1 μmol/L Cu²⁺) 处理细胞 24 h,细胞存活率明显下降 ($P<0.01$);而用铜离子特异性螯合剂 AMT (20 μmol/L) 预处理细胞 1 h,再加入 Ele-Cu²⁺ (50 nmol/L Ele+1 μmol/L Cu²⁺) 处理细胞 24 h,能显著降低 Ele-Cu²⁺对 AML-12 细胞的损伤效果 ($P<0.01$)。因此,后续实验采用 Ele-Cu²⁺ (50 nmol/L Ele+1 μmol/L Cu²⁺) 处理 AML-12 细胞 24 h,用于建立 AML-12 细胞铜死亡模型。

3.2 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞存活率和 LDH 释放率的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低 ($P<0.01$),LDH 释放率明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,给予 TSPJ (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 μg/mL) 干预后,细胞存活率显著升高 ($P<0.05、0.01$),LDH 释放率明显降低 ($P<0.05、0.01$),尤以 25.000 μg/mL TSPJ 作用最佳。因此,选择 25 μg/mL TSPJ 进行后续研究。

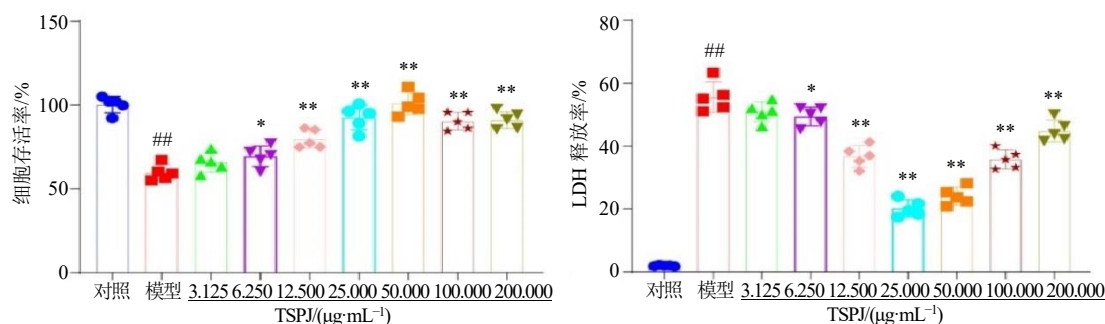


A-给药处理 6 h; B-给药处理 12 h; C-给药处理 24 h; 与对照组比较: $###P<0.01$; 与 Ele-Cu²⁺+AMT 组比较: $**P<0.01$ 。

A-administered for 6 h; B-administered for 12 h; C-administered for 24 h; $###P<0.01$ vs control group; $**P<0.01$ vs Ele-Cu²⁺+AMT group.

图 1 Ele-Cu²⁺对 AML-12 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Effect of Ele-Cu²⁺ on survival rate of AML-12 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)



与对照组比较: $###P<0.01$; 与模型组比较: $*P<0.05$ $**P<0.01$, 下图同。

$###P<0.01$ vs control group; $*P<0.05$ $**P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 2 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞存活率和 LDH 释放率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effect of TSPJ on survival rate and LDH release rate in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ ($\bar{x} \pm s, n=5$)

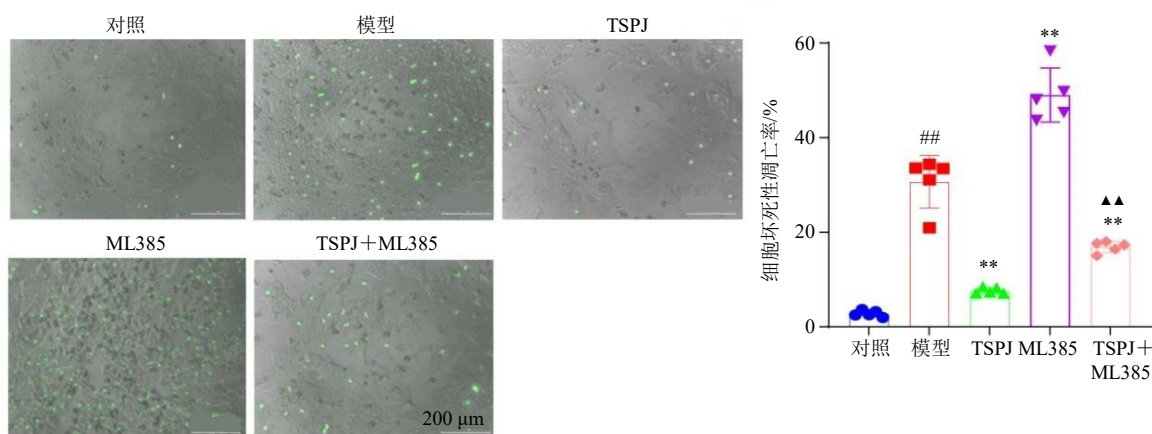
3.3 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞坏死性凋亡的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组细胞坏死性凋亡率明显升高($P<0.01$);与模型组比较,TSPJ 组细胞坏死性凋亡率显著降低($P<0.01$),ML385 组细胞坏死性凋亡率显著升高($P<0.01$);与 TSPJ 组比较,TSPJ+ML385 组细胞坏死性凋亡率显著升高($P<0.01$)。表明 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞坏死性凋亡有较好的抑制作用。

3.4 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞 MMP 水平的影响

线粒体释放的 ROS 可以非特异性地破坏各种细胞大分子、胞膜和线粒体,引起线粒体功能障碍,破坏膜电位稳态,导致 MMP 降低^[30]。JC-1 荧光染

料能够穿过细胞膜选择性地进入线粒体,可随着 MMP 的降低由红色复合物转为绿色单体,其细胞红/绿荧光强度相对比值可以反映线粒体 MMP 变化。如图 4 所示,与对照组比较,模型组 AML-12 细胞中红色复合物转为绿色单体增加,红/绿荧光强度相对比值显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,TSPJ 组 AML-12 细胞中红色复合物转为绿色单体降低,红/绿荧光强度相对比值明显升高($P<0.01$);ML385 组 AML-12 细胞中红色复合物转为绿色单体增加,红/绿荧光强度相对比值显著降低($P<0.01$)。与 TSPJ 组比较,TSPJ+ML385 组 AML-12 细胞中红色复合物转为绿色单体降低,红/绿荧光强度相对比值明显升高($P<0.01$)。表明 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞坏死性凋亡有较好的抑制作用。



与 TSPJ 组比较: ▲▲ $P<0.01$, 下图同。
▲▲ $P<0.01$ vs TSPJ group, same as below figures.

图 3 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞坏死性凋亡的影响 (×200; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Effect of TSPJ on necrotic apoptosis rate in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ (×200; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

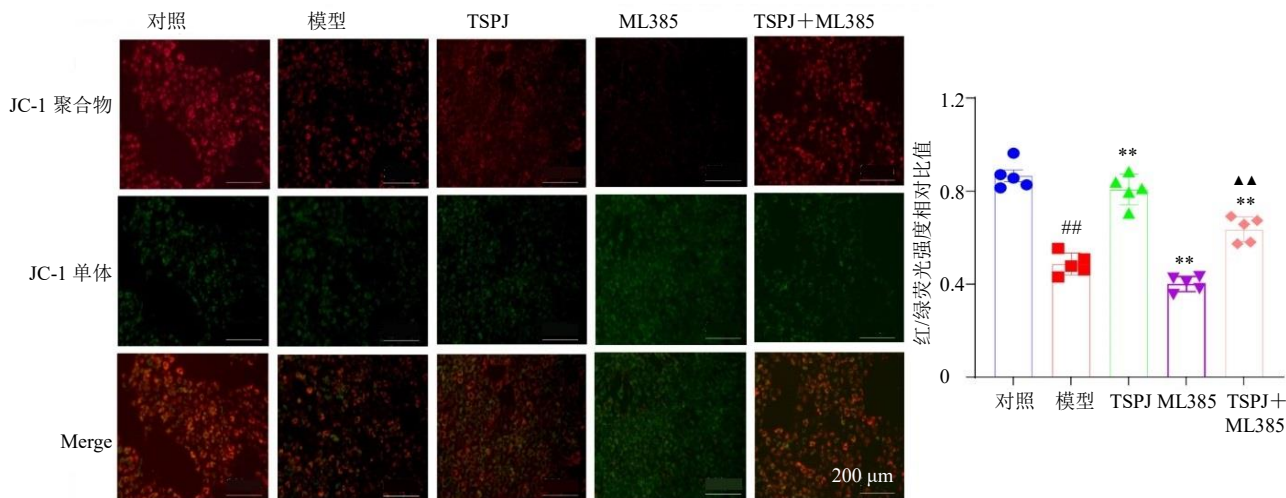


图 4 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞 MMP 水平的影响 (×200; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Effect of TSPJ on MMP level in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ (×200; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.5 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞内 ROS 水平的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组细胞内 ROS 水平明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较, TSPJ 组细胞内 ROS 水平显著降低 ($P<0.01$), ML385 组细胞内 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$);与 TSPJ 组比较, TSPJ+ML385 组细胞内 ROS 水平显著升高 ($P<0.01$)。表明 TSPJ 可以抑制 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞内 ROS 生成。

3.6 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞内 Cu²⁺水平的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组细胞内 Cu²⁺水平明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较, TSPJ 组细胞内 Cu²⁺水平显著降低 ($P<0.01$), ML385 组细胞内 Cu²⁺水平显著升高 ($P<0.01$);与 TSPJ 组比较, TSPJ+ML385 组细胞内 Cu²⁺水平显著升高 ($P<0.01$)。表明 TSPJ 可以降低 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞内 Cu²⁺水平。

3.7 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中氧化应激指标的影响

如图 7 所示,与对照组比较,模型组细胞中 MDA 水平及 MPO 活性明显升高 ($P<0.01$), CAT、GSH、SOD 和 T-AOC 活性明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, TSPJ 组细胞中 MDA 水平及 MPO 活性明显降低 ($P<0.01$), GSH、CAT、SOD 和 T-AOC 活性显著升高 ($P<0.01$); ML385 组细胞中 MDA 水平及 MPO 活性明显升高 ($P<0.01$), GSH、CAT、SOD 和 T-AOC 活性显著降低 ($P<0.01$)。与 TSPJ 组比较, TSPJ+ML385 组细胞中 MDA 水平及 MPO 活性明显升高 ($P<0.01$), CAT、GSH、SOD 和 T-AOC 活性明显降低 ($P<0.01$)。表明 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞具有较好的抗氧化作用。

3.8 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中铜死亡相关蛋白表达的影响

如图 8 所示,与对照组比较,模型组细胞中 HSP70 mRNA 和 HSP70、DLAT 寡聚体蛋白表达水

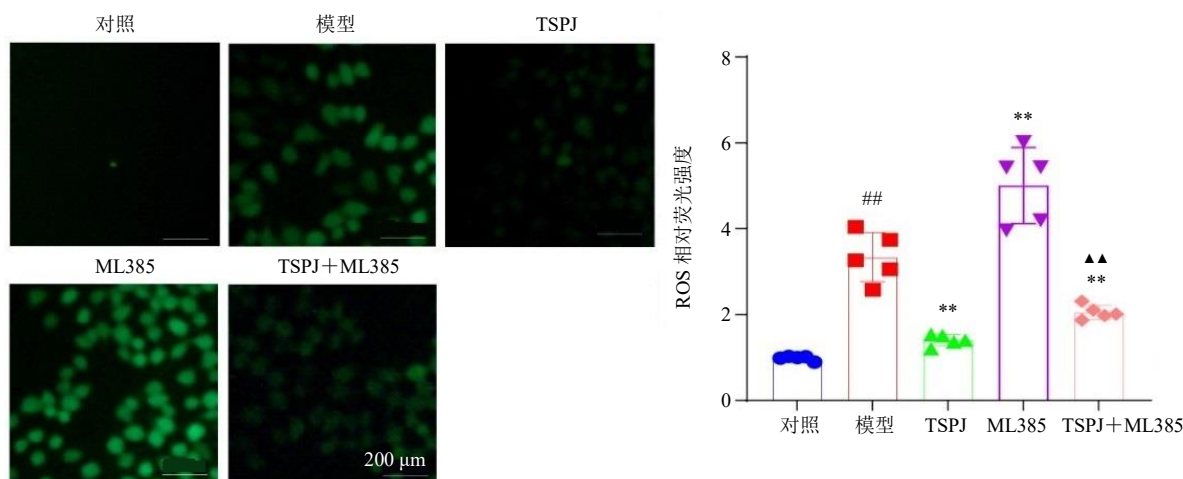


图 5 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞内 ROS 水平的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 5 Effect of TSPJ on ROS level in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

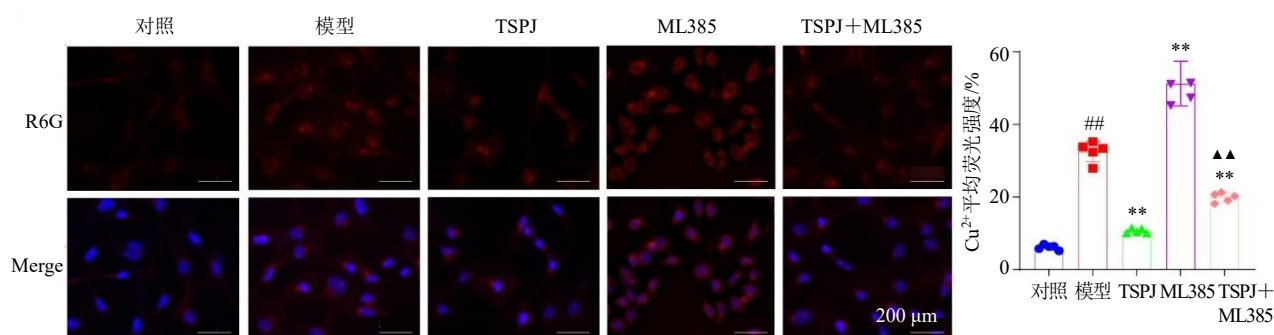


图 6 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞内 Cu²⁺水平的影响 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 6 Effect of TSPJ on Cu²⁺ level in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

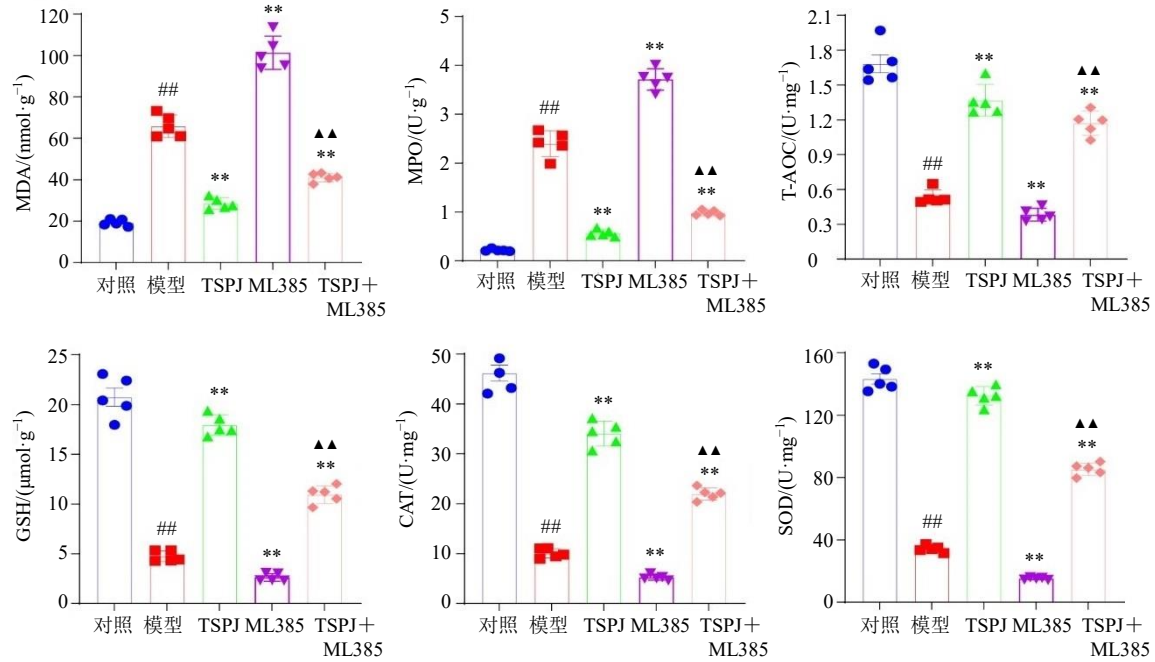


图 7 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of TSPJ on oxidative stress indexes in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

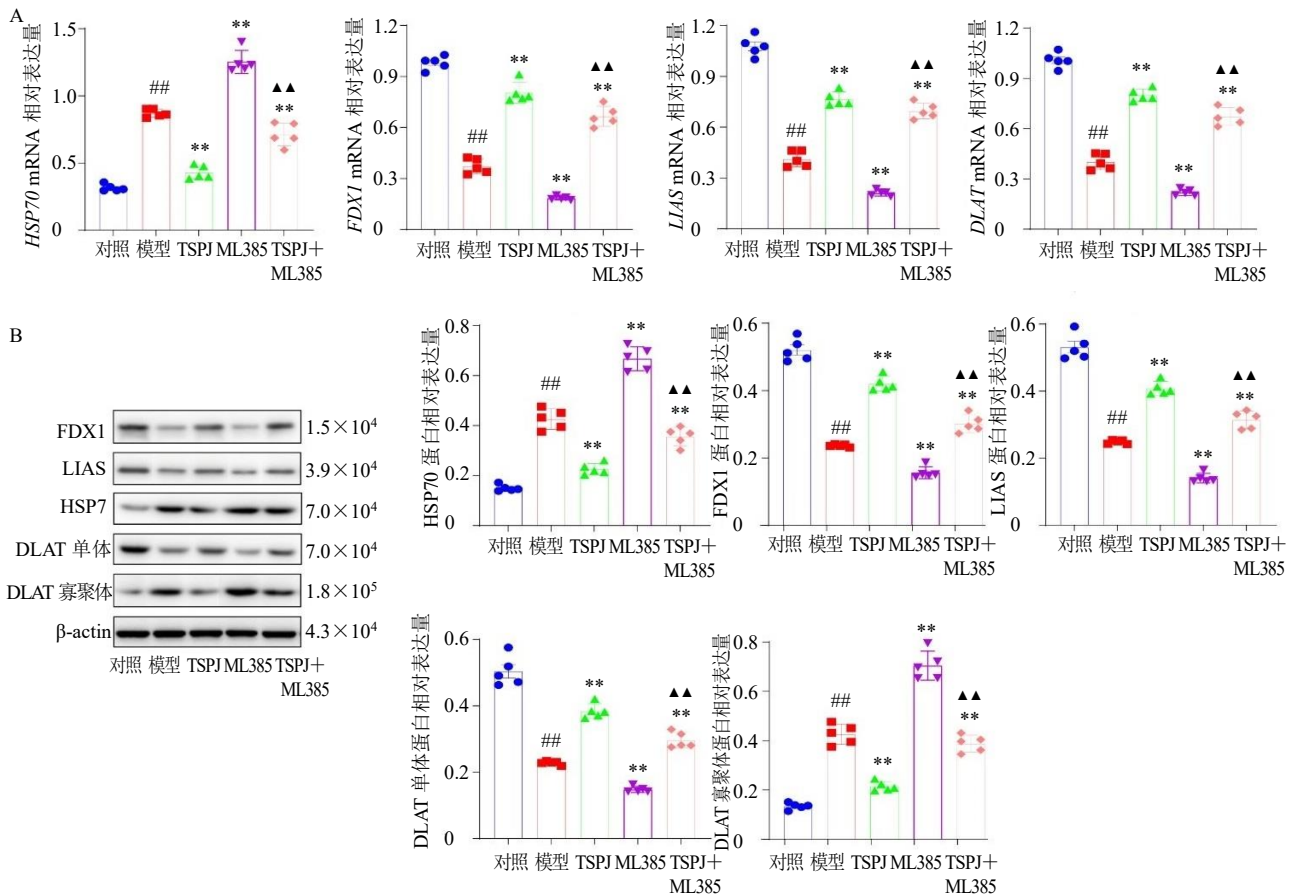


图 8 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中铜死亡相关因子 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effect of TSPJ on mRNA (A) and protein (B) expressions of cuproptosis-related factors in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele-Cu²⁺ ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

平明显升高 ($P < 0.01$), *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* mRNA 和 *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* 单体蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TSPJ 组细胞中 *HSP70* mRNA 和 *HSP70*、*DLAT* 寡聚体蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* mRNA 和 *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* 单体蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); ML385 组细胞中 *HSP70* mRNA 和 *HSP70*、*DLAT* 寡聚体蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* mRNA 和 *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* 单体蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。与 TSPJ 组比较, TSPJ+ML385 组细胞中 *HSP70* mRNA 和 *HSP70*、*DLAT* 寡聚体蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* mRNA 和 *FDX1*、*LIAS*、*DLAT* 单体蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。上述结果表明, TSPJ 可通过调控铜死亡相关蛋白的表达来抑

制 Ele- Cu^{2+} 致 AML-12 细胞铜死亡。

3.9 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中 Keap1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TSPJ 组细胞中 Keap1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); ML385 组细胞中 Keap1 mRNA 表达和蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。

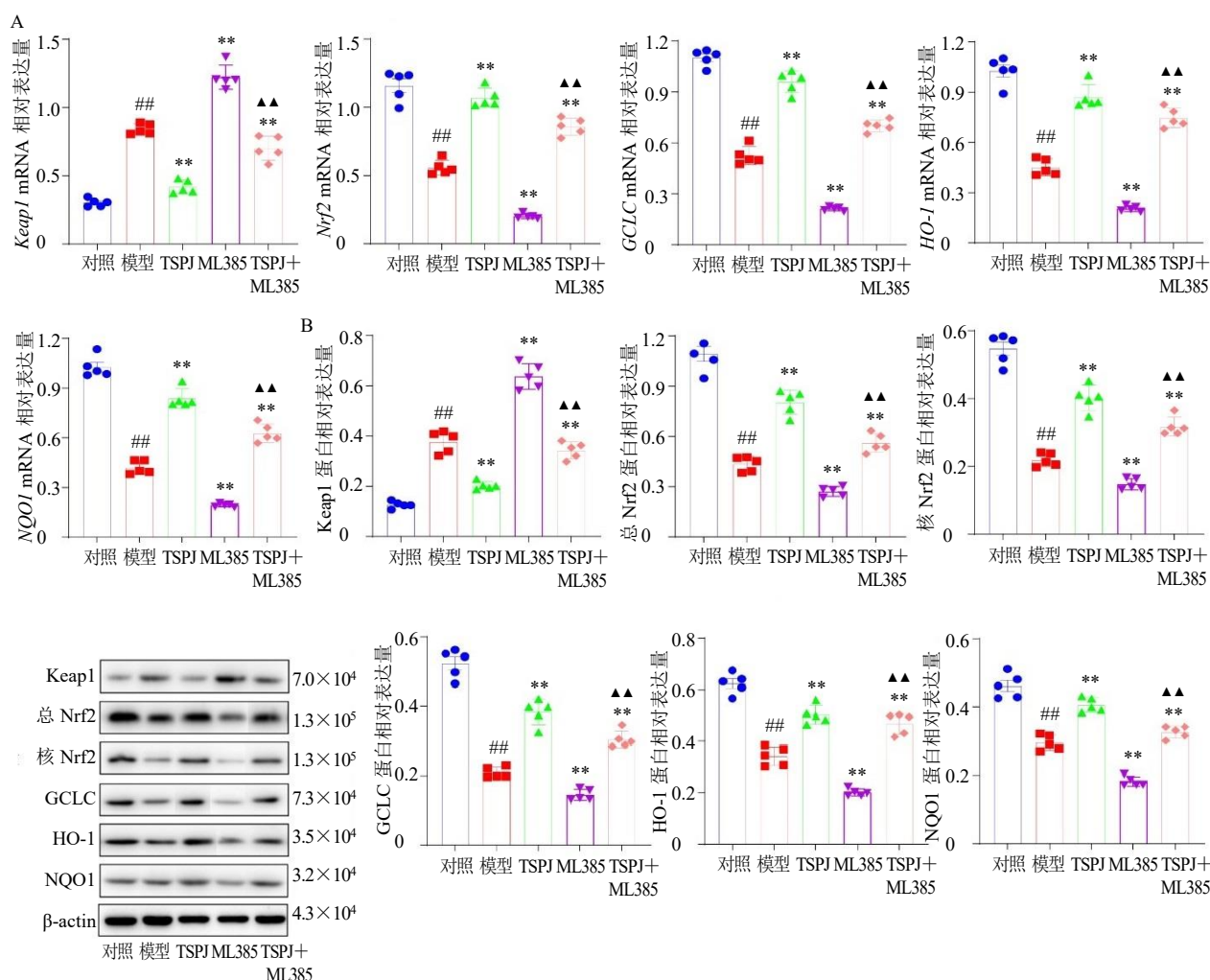


图 9 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路相关因子 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Effect of TSPJ on mRNA (A) and protein (B) expressions of Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway-related factors in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele- Cu^{2+} ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

0.01)。与 TSPJ 组比较, TSPJ+ML385 组细胞中 Keap1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。上述结果表明, TSPJ 可通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 来抑制 Ele- Cu^{2+} 致 AML-12 细胞铜死亡。

3.10 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中铜稳态相关蛋白表达的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组细胞中铜转运蛋白 SLC31A1 及其分子伴侣 ATOX1 mRNA

和蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), 铜转运蛋白 ATP7A、ATP7B 及其分子伴侣 CCS、COX17 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, TSPJ 组细胞中 SLC31A1、ATOX1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), ATP7A、ATP7B、CCS、COX17 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); ML385 组细胞中 SLC31A1、ATOX1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), ATP7A、ATP7B、CCS、COX17 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$)。与 TSPJ 组比较, TSPJ+ML385 组细胞中 SLC31A1、ATOX1 mRNA 和蛋白表达水平

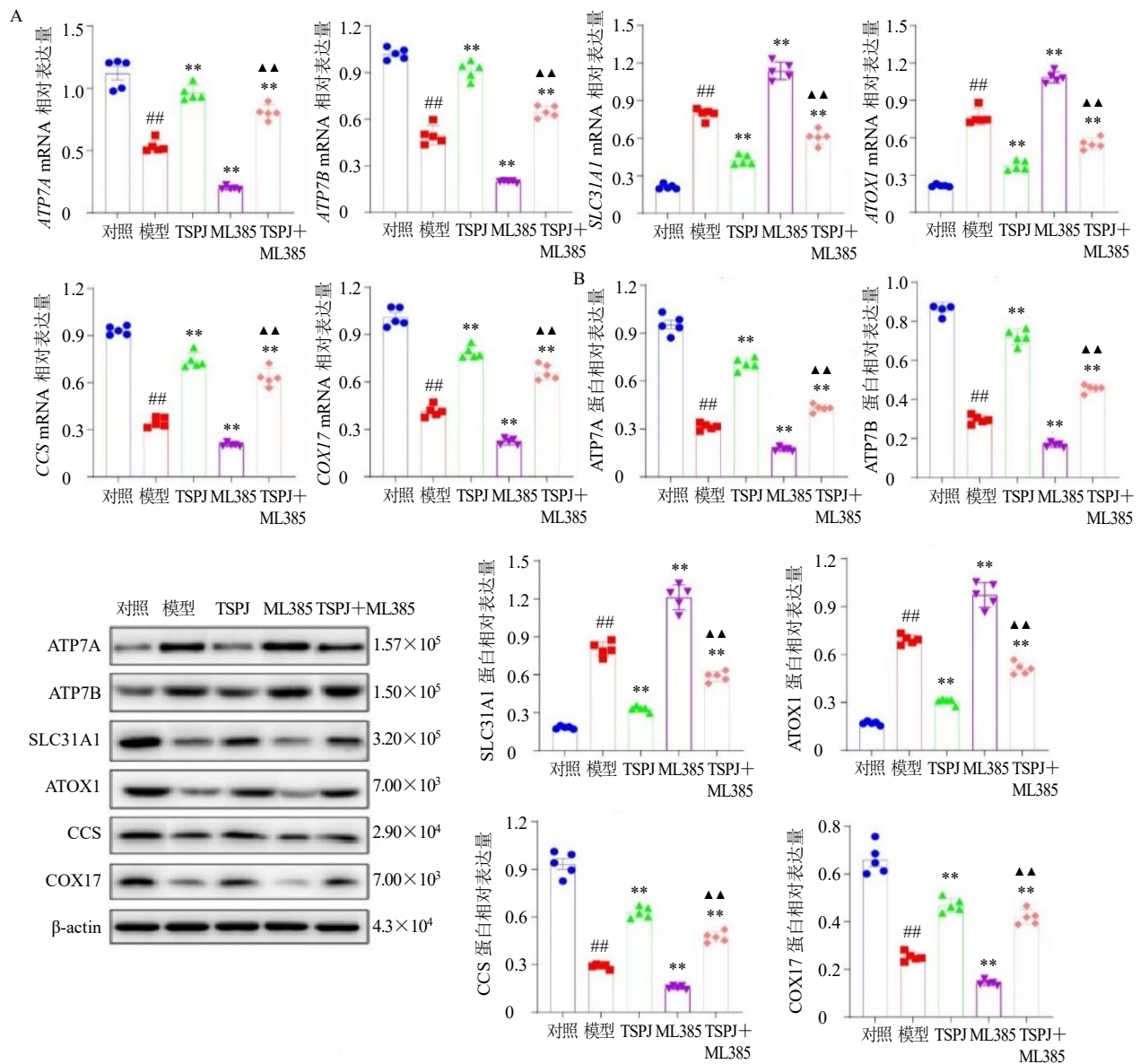


图 10 TSPJ 对 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中铜稳态相关因子 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 10 Effect of TSPJ on mRNA (A) and protein (B) expressions of copper homeostasis-related factors in AML-12 cells cuproptosis induced by Ele- Cu^{2+} ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

明显升高 ($P < 0.01$), ATP7A、ATP7B、CCS、COX17 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。上述结果表明, TSPJ 可通过调节参与铜代谢的转运蛋白和分子伴侣的表达来调节铜稳态、降低细胞内铜离子积累, 进而抑制 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞铜死亡。

4 讨论

TSPJ 为珠子参的重要活性成分^[17], 课题组前期研究证实 TSPJ 可显著改善对乙酰氨基酚所致的肝损伤, 且能够有效逆转四氯化碳所致的肝纤维化^[18-23]。基于上述发现, 本研究通过 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞铜死亡模型研究 TSPJ 对铜死亡 AML-12 细胞的影响及可能作用机制。结果显示, 给予 3.125、6.250、12.500、25.000 $\mu\text{g/mL}$ TSPJ 干预可显著提高 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞存活率, 并显著抑制 LDH 释放, 提示 3.125~25.000 $\mu\text{g/mL}$ TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞具有较好的保护作用; 而当 TSPJ 质量浓度大于 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其对细胞存活率的改善呈现下降趋势, 与其对 LDH 释放率抑制作用降低一致, 符合文献报道^[31-32]的药物在一定浓度范围内有细胞保护作用, 超过该浓度会出现抑制作用。进一步研究发现 25 $\mu\text{g/mL}$ TSPJ 可显著降低 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞坏死性凋亡率、细胞 ROS 和 Cu²⁺水平, 升高 MMP 水平及细胞中 CAT、GSH、SOD、T-AOC 活性, 降低细胞中 MDA 水平及 MPO 活性, 升高细胞中 *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1*、*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*ATP7A*、*ATP7B*、*CCS*、*COX17* mRNA 和总 *Nrf2*、胞核 *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1*、*FDX1*、*LIAS*、*DLAT* 单体、*ATP7A*、*ATP7B*、*CCS*、*COX17* 蛋白表达, 降低细胞中 *Keap1*、*HSP70*、*SLC31A1*、*ATOX1* mRNA 和 *Keap1*、*HSP70*、*DLAT* 寡聚体、*SLC31A1*、*ATOX1* 蛋白表达, 揭示了 TSPJ 在抑制铜死亡方面的新功能。

铜作为催化辅因子参与许多生物反应, 在生物体中起着至关重要的作用。而铜代谢是一个复杂而动态的过程, 在全身和细胞内途径都受到严格调控。铜离子可以在 Cu⁺和 Cu²⁺之间转换, 一些关键的蛋白或者酶也利用铜的高度氧化还原活性完成各自的生理功能, 如 SOD、细胞色素 C 氧化酶和赖氨酰氧化酶。游离铜具有毒性, 会破坏细胞膜、蛋白质和核酸^[33]。通常情况下, 肠道吸收、全身循环、细胞利用和排泄都参与调节体内铜的分布和稳态, 将生理铜离子水平维持在安全范围内^[34-35]。肝脏在铜的调节中起着核心作用, 包括其储存、全身分布

和胆汁排泄, 使得其极易受到铜毒性的影响^[36]。研究表明, 铜诱导的肝毒性具有多种机制, 如通过芬顿反应促进 ROS 的产生氧化损伤和程序性细胞死亡^[37-38]。除了金属离子的固有毒性外, ROS 对生物分子也表现出强烈的破坏作用。Wang 等^[39]研究发现, 铜暴露导致 ROS 产生增加, 血清和肝脏中 MDA 积累, T-AOC 降低, 表明铜暴露造成了肝组织依赖性损伤, 包括肝功能障碍、氧化应激和铜死亡。以上研究提示, 铜暴露会促进肝细胞大量生成 ROS, 降低其抗氧化能力, 促进细胞凋亡/死亡。本研究结果显示, Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中 MDA 水平及 MPO 活性明显升高, CAT、GSH、SOD 和 T-AOC 活性明显降低; 给予 TSPJ 干预可降低 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中 ROS、MDA 积累和 MPO 活性。此外, TSPJ 干预增加了肝细胞中 CAT、GSH、SOD 和 T-AOC 活性, 与 TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞坏死性凋亡率 MMP 的改善作用一致; 而 *Nrf2* 抑制剂 ML385 能够显著减弱 TSPJ 的作用。表明 TSPJ 可以通过增强肝细胞的抗氧化能力来抑制铜暴露引起的 AML-12 细胞氧化损伤。

Keap1/*Nrf2*/*ARE* 信号通路在细胞防御氧化应激中起着至关重要的作用, 也是细胞内氧化还原稳态和内源性抗氧化系统的核心调节因子^[40-41]。体内铜的含量对 *Keap1*/*Nrf2*/*ARE* 信号通路的调节也至关重要。Du 等^[42]研究发现过量的铜可以上调创伤后脑损伤小鼠脑组织中 *Keap1* mRNA 和蛋白表达, 下调 *Nrf2* mRNA 和蛋白表达, 证实过表达 *circSpna2* 可通过 *Keap1*/*Nrf2* 信号通路抑制小鼠脑组织铜死亡, 改善小鼠脑损伤。*Nrf2* 是一种关键的转录因子, 通过与 *Keap1* 结合来协调细胞抗氧化防御机制。在氧化应激条件下, ROS 的持续产生促进了 *Nrf2* 与 *Keap1* 的解离。*Nrf2* 随后入核, 并与 *ARE* 结合, 最终调节下游抗氧化酶如 *HO-1*、*NQO1*、*GCLC* 的表达, 增强内源性抗氧化系统功能, 降低铜暴露引起的氧化应激^[43]。因此, 激活 *Keap1*/*Nrf2*/*ARE* 信号通路可减轻氧化应激, 增加内源性抗氧化系统功能, 有效抑制铜暴露造成肝细胞铜死亡。本研究结果表明, Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中 *Keap1* mRNA 和蛋白表达水平明显升高, *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1* mRNA 和总 *Nrf2*、胞核 *Nrf2*、*GCLC*、*HO-1*、*NQO1* 蛋白表达水平明显降低; TSPJ 干预可降低 Ele-Cu²⁺致铜死亡 AML-12 细胞中 *Keap1* mRNA 和蛋白表达水平, 上调 *Nrf2*、*GCLC*、*HO-*

1、NQO1 mRNA 和总 Nrf2、胞核 Nrf2、GCLC、HO-1、NQO1 蛋白表达, 与其降低细胞内 Cu^{2+} 水平结果一致。而 Nrf2 抑制剂 ML385 能够显著减弱 TSPJ 的作用。上述结果表明 TSPJ 可能通过激活 Nrf2 和诱导 ARE 依赖性基因表达来改善氧化应激, 抑制 AML-12 细胞铜死亡。

细胞铜死亡的重要特征是胞内铜离子积累, 积累的铜离子直接与三羧酸循环中 DLAT 结合, 促进 DLAT 寡聚, FDX1、LIAS 等铁硫簇蛋白表达降低, 使得胞内 Cu^{2+} 还原成毒性更强的 Cu^+ , 破坏细胞膜、蛋白质和核酸, 导致 Fe-S 簇蛋白表达减少和 HSP70 表达升高, 铜离子积累增加, 从而诱发细胞应激和 ROS 大量生成, 最终导致细胞铜死亡^[10,44-45]。刘思彤等^[46]研究发现参麦注射液能显著降低心肌纤维化大鼠心肌组织中 HSP70 蛋白表达, 升高 DLAT、FDX1、LIAS 蛋白表达水平, 进而抑制心肌纤维化大鼠心脏铜死亡。由此可见, HSP70、LIAS、FDX1、DLAT 铜死亡相关蛋白在铜死亡中发挥着重要作用。本研究发现 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中 HSP70 mRNA 和 HSP70、DLAT 寡聚体蛋白表达水平明显升高, FDX1、LIAS、DLAT mRNA 和 FDX1、LIAS、DLAT 单体蛋白表达水平明显降低; 给予 TSPJ 干预后, 细胞中 HSP70 mRNA 和 HSP70、DLAT 寡聚体蛋白表达水平明显降低, FDX1、LIAS、DLAT mRNA 和 FDX1、LIAS、DLAT 单体蛋白表达水平明显升高。表明 TSPJ 抑制铜暴露引起的 AML-12 细胞铜死亡与其调控铜死亡相关蛋白表达有关。

细胞内过高的铜离子是导致细胞铜死亡的重要因素^[47]。膳食中的铜离子经肠道进入血液后与血清蛋白结合, 转运至肝脏储存以满足机体能量代谢和抗氧化需要^[48]。当机体受到损伤相关模式分子或病原体相关模式分子刺激后, 细胞膜上的铜转运蛋白 SLC31A1 及其分子伴侣 ATOX1 (管控铜离子进入细胞) 表达升高, 铜转运蛋白 ATP7A 和 ATP7B 及其分子伴侣 CCS 和 COX17 (管控铜离子离开细胞) 表达降低, 引起细胞内铜离子积累, 导致铜稳态异常, 游离铜升高, 从而诱发细胞应激和 ROS 大量生成, 促进细胞铜死亡^[49-50]。以上研究表明铜转运蛋白对维持细胞内铜稳态起着重要作用。本研究采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测了 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中 SLC31A1、ATP7A 和 ATP7B 以及其分子伴侣 ATOX1、CCS 和 COX17 的 mRNA 和蛋白表达, 发现 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞中铜转运蛋白 SLC31A1 及其分子伴侣 ATOX1 mRNA 和蛋白表达明显升高, 铜转运蛋白 ATP7A、ATP7B 及其分子伴侣 CCS、COX17 mRNA 和蛋白表达明显降低; TSPJ 干预可显著降低 SLC31A1、ATOX1 的 mRNA 和蛋白表达, 上调 ATP7A、ATP7B、CCS 和 COX17 的 mRNA 和蛋白表达, 此结果与其降低 Ele- Cu^{2+} 致铜死亡 AML-12 细胞内 Cu^{2+} 水平、坏死性凋亡率和升高 MMP 水平一致。以上结果表明 TSPJ 可能通过改变参与铜代谢的转运蛋白和伴侣表达来调节铜稳态、抑制肝细胞铜死亡 (图 11)。

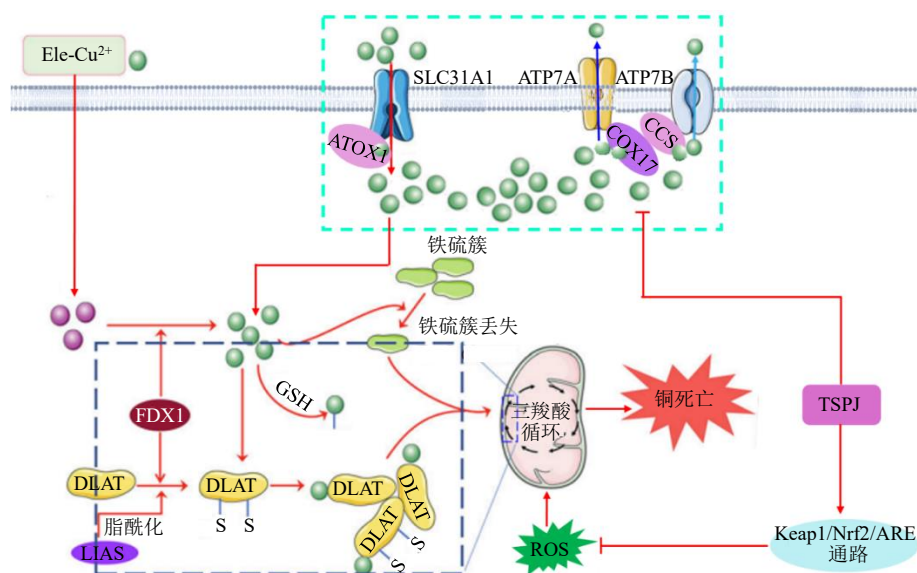


图 11 TSPJ 抑制伊利司莫联合铜离子诱导 AML-12 细胞铜死亡的作用机制

Fig. 11 Mechanism of TSPJ suppressing AML-12 cell cuproptosis induced by elesclomol combined with copper ions

综上, TSPJ 对 Ele-Cu²⁺致 AML-12 细胞铜死亡有显著的抑制作用, 其作用机制可能与激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路, 调节铜稳态和铜死亡相关蛋白的表达, 降低细胞内 Cu²⁺水平, 抑制氧化应激和 ROS 大量生成, 进而抑制肝细胞铜死亡密切相关。本研究为阐释 TSPJ 抗铜暴露诱导的肝损伤潜在机制提供了新见解, 其有望成为治疗肝损伤的候选药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ding L, Liu Y J, Kang M, *et al.* UPLC-QTOF/MS metabolomics and biochemical assays reveal changes in hepatic nutrition and energy metabolism during sexual maturation in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Biology*, 2022, 11(11): 1679.
- [2] Wei H W, Zhao T, Liu X L, *et al.* Mechanism of action of dihydroquercetin in the prevention and therapy of experimental liver injury [J]. *Molecules*, 2024, 29(15): 3537.
- [3] Asrani S K, Devarbhavi H, Eaton J, *et al.* Burden of liver diseases in the world [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 151-171.
- [4] Rodriguez-Frias F, Rando-Segura A, Quer J. Solved the enigma of pediatric severe acute hepatitis of unknown origin? [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1175996.
- [5] Nan Y, Su H C, Lian X M, *et al.* Pathogenesis of liver fibrosis and its TCM therapeutic perspectives [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 5325431.
- [6] Guo L Y, Lei J Y, Li P, *et al.* Hedan tablet ameliorated non-alcoholic steatohepatitis by moderating NF- κ B and lipid metabolism-related pathways via regulating hepatic metabolites [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(7): e18194.
- [7] Chen L Y, Min J X, Wang F D. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 378.
- [8] Thiele D J. Integrating trace element metabolism from the cell to the whole organism [J]. *J Nutr*, 2003, 133(5 Suppl 1): 1579S-1580S.
- [9] Meram I, Sirmatel F, Ahi S, *et al.* Plasma copper and zinc levels in chronic viral hepatitis [J]. *Saudi Med J*, 2004, 25(8): 1066-1069.
- [10] Luo X Y, Linghu M Y, Zhou X R, *et al.* Merestininb inhibits cuproptosis by targeting NRF2 to alleviate acute liver injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 229: 68-81.
- [11] Festa R A, Thiele D J. Copper: An essential metal in biology [J]. *Curr Biol*, 2011, 21(21): R877-R883.
- [12] Tonelli C, Chio I I C, Tuveson D A. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1727-1745.
- [13] Wang R, Luo Y Z, Lu Y D, *et al.* Maggot extracts alleviate inflammation and oxidative stress in acute experimental colitis via the activation of Nrf2 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4703253.
- [14] Xu B, Wang S Y, Li R W, *et al.* Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells *in vitro* and *in vivo* by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- κ B and Nrf2 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2797.
- [15] Li N, Du H, Mao L J, *et al.* Reciprocal regulation of NRF2 by autophagy and ubiquitin-proteasome modulates vascular endothelial injury induced by copper oxide nanoparticles [J]. *J Nanobiotechnol*, 2022, 20(1): 270.
- [16] Schwabe R F, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: A matter of life and death [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(12): 738-752.
- [17] 任华忠, 朱丽金, 何毓敏. 珠子参总皂苷的 HPLC 特征图谱及化学成分研究 [J]. *中成药*, 2022, 44(9): 2885-2890.
- [18] 石孟琼, 张继红, 周刚, 等. 基于 ERK/NF- κ B/COX-2 信号通路研究珠子参总皂苷改善对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(10): 2585-2596.
- [19] 张继红, 邓为, 石孟琼, 等. 珠子参皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(5): 73-78.
- [20] 张继红, 王心怡, 石孟琼, 等. 珠子参皂苷诱导骨髓干细胞分化为肝样细胞的体外实验研究 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 103-106.
- [21] 张继红, 王海燕, 石孟琼, 等. 珠子参皂苷与 BMSCs 联用治疗大鼠肝纤维化作用研究 [J]. *三峡大学学报: 自然科学版*, 2016, 38(3): 104-107.
- [22] Zhang J H, Shi M Q, He H B, *et al.* Hepatoprotective effects of saponins from *Rhizoma Panacis Majoris* on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Appl Mech Mater*, 2014, 568/569/570: 1915-1920.
- [23] 张海潮, 周瑞, 唐志书, 等. 基于网络药理学、分子对接、体外细胞实验预测珠子参保肝机制 [J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2342-2351.
- [24] Zhu L Q, Zhang J H, Hu Y Q, *et al.* Total saponins from *Panax japonicus* regulate the ferritin heavy chain to reduce inflammation in aging adipose tissue by mediating iron metabolism [J]. *J Ginseng Res*, 2025, 49(2): 134-144.
- [25] Li D J, Chen M H, He H B, *et al.* Saponins from *Rhizoma Panacis Majoris* attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury via the activation of the Sirt1/FoxO1/

- PGC-1 α and Nrf2/antioxidant defense pathways in rats [J]. *Phcog Mag*, 2018, 14(56): 297.
- [26] 张莎莎, 石莹莹, 吴春香, 等. 伊利司莫诱导子宫内膜癌细胞发生铜死亡的作用机制 [J]. *医药导报*, 2024, 43(9): 1393-1397.
- [27] Chen H, Li D, Zhang H, *et al.* Mechanisms of copper metabolism and cuproptosis: Implications for liver diseases [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1633711.
- [28] Yasuda H, Takishita Y, Morita A, *et al.* Sodium acetate enhances neutrophil extracellular trap formation via histone acetylation pathway in neutrophil-like HL-60 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16): 8757.
- [29] Jiang Y, Xie F, Ling X T, *et al.* TCA cycle intermediate mitigates di(2-ethylhexyl) phthalate-induced cholestatic liver injury through modulation of the Nrf2/NQO1 signalling axis [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2025, 136(6): e70047.
- [30] Bai J R, Xie N, Hou Y, *et al.* The enhanced mitochondrial dysfunction by cantleyoside confines inflammatory response and promotes apoptosis of human HFLS-RA cell line via AMPK/Sirt 1/NF- κ B pathway activation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 149: 112847.
- [31] 曹策, 杨丽丽, 宋鉴书, 等. 积雪草苷调控 PIK3C3/DYNC2H1/TUB 减轻转化生长因子- β 1 诱导的心肌成纤维细胞活化 [J]. *中草药*, 2025, 56(14): 5108-5118.
- [32] He H B, Feng M L, Xu H Y, *et al.* Total triterpenoids from the fruits of *Chaenomeles speciosa* exerted gastroprotective activities on indomethacin-induced gastric damage via modulating microRNA-423-5p-mediated TFF/NAG-1 and apoptotic pathways [J]. *Food Funct*, 2020, 11(1): 662-679.
- [33] 王拓远, 阙斐, 李芳芳, 等. 铜离子对酿酒酵母能量代谢及细胞膜功能的影响 [J]. *食品科技*, 2017(10): 5.
- [34] Li L Y, Shi J H, Liu W Y, *et al.* Copper overload induces apoptosis and impaired proliferation of T cell in zebrafish [J]. *Aquat Toxicol*, 2024, 267: 106808.
- [35] Tang D L, Kroemer G, Kang R. Targeting cuproplasia and cuproptosis in cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2024, 21(5): 370-388.
- [36] Yang Y N, Wu J X, Wang L S, *et al.* Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease [J]. *MedComm*, 2024, 5(10): e724.
- [37] Wang X, Ling W K, Zhu Y, *et al.* Spermidine alleviates copper-induced oxidative stress, inflammation and cuproptosis in the liver [J]. *FASEB J*, 2025, 39(6): e70453.
- [38] Zhong G L, Li Y X, Li L, *et al.* Mitochondrial miR-12294-5p regulated copper-induced mitochondrial oxidative stress and mitochondrial quality control imbalance by targeted inhibition of CISD1 in chicken livers [J]. *J Hazard Mater*, 2023, 458: 131908.
- [39] Wang W K, Lu K Z, Jiang X, *et al.* Ferroptosis inducers enhanced cuproptosis induced by copper ionophores in primary liver cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 142.
- [40] 黄伟, 李倩, 朱继田. 基于 Nrf2/GPX4 通路研究枸杞多糖对缺氧/复氧诱导的心肌细胞铁死亡的影响 [J]. *中草药*, 2025, 56(10): 3568-3576.
- [41] 丁美灵, 高铭, 包懿文, 等. 基于 p62-Keap1-Nrf2 信号通路探讨荆防颗粒对酒精性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. *中草药*, 2024, 55(19): 6588-6598.
- [42] Du M R, Fu J, Zhang J, *et al.* CircSpna2 attenuates cuproptosis by mediating ubiquitin ligase Keap1 to regulate the Nrf2-Atp7b signalling axis in depression after traumatic brain injury in a mouse model [J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(11): e70100.
- [43] Wang S L, Huang J, Chen Y T, *et al.* Qifu-Yin activates the Keap1/Nrf2/ARE signaling and ameliorates synaptic injury and oxidative stress in APP/PS1 mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333: 118497.
- [44] 雷海桃, 王海东, 王金海, 等. 铜死亡调控机制的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(8): 1491-1498.
- [45] Cheng Y F, Wang G Q, Yang X X, *et al.* Artesunate alleviates Parkinson's disease by targeting astrocyte MT2A to attenuate dopamine neuronal cuproptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2025, 219: 107895.
- [46] 刘思彤, 郭志远, 邹槌, 等. 参麦注射液调控铜死亡在心肌纤维化大鼠中的作用及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(6): 1601-1609.
- [47] 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.
- [48] Linder M C, Wooten L, Cerveza P, *et al.* Copper transport [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67(5 suppl): 965S-971S.
- [49] Cai L, Tan Y, Holland B, *et al.* Diabetic cardiomyopathy and cell death: Focus on metal-mediated cell death [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2024, 24(2): 71-84.
- [50] Ke D, Zhang Z, Liu J T, *et al.* Ferroptosis, necroptosis and cuproptosis: Novel forms of regulated cell death in diabetic cardiomyopathy [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1135723.

[责任编辑 李亚楠]