

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0305

论著

GCLM 调控肝细胞肝癌细胞增殖及机制研究

李茗鹤, 白楠, 孙笑, 洪丹丹, 李咏梅

(天津医科大学基础医学院病原生物学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶修饰亚基(GCLM)对肝细胞肝癌(HCC)细胞增殖的作用及机制。方法:利用 GEPIA、HPA 数据库分析 HCC 组织和正常肝组织中 GCLM 表达情况;构建 GCLM 稳定敲降的 HCC 细胞株;CCK-8、克隆形成实验检测细胞增殖水平;铜测定实验检测细胞铜离子水平;铜死亡激活实验检测 GCLM 对细胞铜死亡的影响。结果:与正常肝组织相比, HCC 组织中 GCLM mRNA($P<0.0001$)与蛋白表达水平明显升高;与对照组相比, GCLM 敲降的 MHCC97L 细胞中 GCLM 的 mRNA($F=255.20, P<0.001$)与蛋白($F=50.77, P<0.01$)表达水平下降;与对照组相比, GCLM 敲降的 MHCC97L 细胞增殖减弱($F=42.79, P<0.01$)、细胞克隆数量减少($F=1102, P<0.001$);与对照组相比, GCLM 敲降的 MHCC97L 细胞内铜离子水平升高($t=12.03, P<0.001$);与对照组相比, Elesclomol 和 CuCl_2 联合处理的 MHCC97L 细胞增殖减弱($F=46.42, P<0.001$), Elesclomol 或 CuCl_2 单独处理的 MHCC97L 细胞增殖均无明显变化($F=2.17, P=0.17$)。结论: HCC 组织中 GCLM 表达水平升高, GCLM 敲降通过促进铜死亡来减弱 HCC 细胞增殖。

关键词 GCLM; 肝细胞肝癌; 铜死亡

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)04-0305-05

Study on the regulation and mechanism of GCLM in cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells

LI Minghe, BAI Nan, SUN Xiao, HONG Dandan, LI Yongmei

(Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect and underlying mechanism of γ -glutamate-cysteine ligase modifier subunit(GCLM) on cell proliferation in hepatocellular carcinoma(HCC) cells. **Methods:** GEPIA and HPA databases were used to assess GCLM expression levels in HCC and normal liver tissues. HCC cells line with stable GCLM knockdown were constructed. The cell proliferation levels were detected by CCK-8, and colony formation assays. The level of Cu^{2+} in cells was detected by copper assay. The effect of GCLM on cuproptosis was detected by the cuproptosis activation experiment. **Results:** Compared with normal liver tissues, GCLM mRNA($P<0.0001$) and protein was highly expressed in HCC. Compared with the control group, the GCLM mRNA($F=255.20, P<0.001$) and protein($F=50.77, P<0.01$) expression levels were decreased in MHCC97L cells with GCLM knockdown. Compared with the control group, MHCC97L cells with GCLM knockdown showed decreased proliferation($F=42.79, P<0.01$) and reduced colony formation ability($F=1102, P<0.001$). Compared with the control cells, the Cu^{2+} level of was significantly increased($t=12.03, P<0.001$) in MHCC97L cells with GCLM knockdown. When combined treatment with Elesclomol and CuCl_2 , the proliferation of MHCC97L cells were inhibited($F=46.42, P<0.001$) compared to the control cells. However, there was no significant effect on MHCC97L cells proliferation using Elesclomol or CuCl_2 alone($F=2.17, P=0.17$). **Conclusion:** GCLM is highly expressed in HCC tissues. GCLM knockdown inhibits HCC cell proliferation by promoting cell cuproptosis.

Key words GCLM; hepatocellular carcinoma; cuproptosis

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌的主要组织学类型,在所有原发性肝癌中占比 80%^[1]。在世界范围内,约 72%的 HCC 发生在亚洲^[2],中国的 HCC 发病率为 18.3 例/10 万,由于人口基数庞大,总病例数在全球各国中排名第一位^[3]。HCC 通常在晚期才能被诊断,晚期 HCC 可采用肝动脉化疗栓塞、免疫疗法等进行治疗,自 2018 年起索拉非尼、仑伐替尼等靶向治疗药物被应用为晚期

HCC 治疗的一线药物^[4],但因高复发和耐药性的出现,目前大多数 HCC 患者的预后仍较差^[5]。因此, HCC 致病机制的深入研究及寻找更有效的治疗靶点对于 HCC 临床治疗具有十分重要的意义。

γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶修饰亚基(glutamate-cysteine ligase modifier subunit, GCLM)是生成谷胱甘肽(glutathione, GSH)的限速酶 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(glutamate cysteine ligase, GCL)的修饰亚基。有研究通过构建 GCLM 基因敲除小鼠乳腺肿瘤模型,发现 GCLM 基因敲除组发病延迟,肿瘤细胞增殖减慢并且浸润性减弱。在肉瘤和淋巴瘤、胸腺

基金项目 天津市教科科研项目(2022ZD055)

作者简介 李茗鹤(1998-),女,硕士在读,研究方向:病原生物学;通信作者:李咏梅, E-mail: liym@tmu.edu.cn。

瘤小鼠模型中,GCLM 基因敲除同样导致肿瘤细胞增殖减慢^[6]。所以,GCLM 在肿瘤发生、发展中的作用机制研究对于发现新的肿瘤标志物或肿瘤治疗新靶点意义重大,但目前 GCLM 的功能与 HCC 发生、发展之间的关系有待研究。本文旨在探讨 GCLM 对 HCC 细胞增殖的影响及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和实验材料 人 HCC 细胞株 MHCC97L 及 293T 细胞株为本实验室留存的细胞系;DMEM 完全培养基(MA0212)购自美仑公司;标准胎牛血清(FBSST-01033)购自赛业公司;0.25%胰蛋白酶(C100C1) 购自新赛美公司;Trizol(CW0580S)、BCA 定量试剂盒(CW0014S)购自康为世纪公司;RIPA 裂解液(R0010)、puromycin(P8230)购自索莱宝公司;结晶紫染色液(C0121)购自碧云天公司;Lipo2000 Plus(L7003)、CCK-8 试剂盒(C6005M)、逆转录试剂盒(R2028)购自宇恒公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒(S2024)购自全式金公司;蛋白 Marker(WJ103) 购自雅酶公司;质粒和引物合成自金唯智公司;GCLM 抗体(ab124827)购自艾博抗公司; β -actin 抗体(AB0035)购自泊湾生物公司;山羊抗兔 IgG 抗体(CS2204A) 购自 Cohesion 公司;铜测定试剂盒(E010-1-1)购自南京建成公司;Elesclomol(HY-12040)购自 MCE 公司; CuCl_2 (C3207)购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 数据库分析 利用 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn>)分析 HCC 组织和正常肝组织中 GCLM mRNA 表达情况;利用 HPA(<https://www.proteinatlas.org/>)分析 HCC 组织和正常肝组织中 GCLM 蛋白表达情况。

1.2.2 细胞培养及传代 MHCC97L 和 293 T 细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基中培养,并置于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中。用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞并传代。

1.2.3 实验分组 将感染对照质粒的 MHCC97L 细胞设为未敲降对照组;将感染 shGCLM-1/2 质粒的 MHCC97L 细胞设为 GCLM 敲降组。将未加药处理的 MHCC97L 细胞设为未加药对照组;将 Elesclomol 或 CuCl_2 单独处理的未敲降对照组和 GCLM 敲降组细胞设为单独用药组;将 Elesclomol 和 CuCl_2 共同处理的未敲降对照组和 GCLM 敲降组细胞设为联合用药组。

1.2.4 GCLM 稳定敲降的 HCC 细胞株构建 分别用 shGCLM-1/2 质粒或其对照质粒与慢病毒辅助质

粒 pRSV-REV、骨架质粒 pMDLg-pRRE 和包膜质粒 pMD2.0G 共转染 293 T 细胞。收集过筛后慢病毒液感染 MHCC97L 细胞 48 h 后,用含有 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的 DMEM 完全培养基进行筛选。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR。反应条件为:预变性阶段:95℃,120 s,1 个循环;扩增阶段:95℃,5 s,60℃,30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。实时荧光定量 PCR 引物序列:18s:(F:5'-GCTTAATTTGACTCAACACG-GGA-3',R:5'-GCTTAATTTGACTCAACACGGGA-3');GCLM:(F:5'-AGTGGGCACAGGTAAAACCA-3',R:5'-TGACCGAATACCGCAGTAGC-3')。

1.2.6 细胞总蛋白提取和 Western 印迹实验 收集细胞,加入 RIPA 裂解液,超声裂解细胞,离心后取上清用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白变性后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量均为 10 μg ,随后将蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h。4℃孵育一抗 anti-GCLM(1:1 000)、anti- β -actin(1:5 000)过夜。次日室温孵育二抗山羊抗兔 IgG 抗体(1:5 000)1 h。用 Tanon-5200 化学发光成像仪进行 ECL 显色。

1.2.7 CCK-8 实验 96 孔板每孔接种 1 000 个细胞,检测时每孔换含 10% CCK-8 试剂的 DMEM 完全培养基,37℃、5% CO_2 孵育 3 h,酶标仪测定 450 nm 吸光度。以每次测定吸光度的时间作为横坐标,以每次测定的吸光度数值作为纵坐标,用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制 CCK-8 折线图。

1.2.8 平板克隆形成实验 6 孔板每孔接种 1 000 个细胞,每 3 d 更换新鲜 DMEM 完全培养基,培养 2 周。弃去培养基,PBS 清洗,加入 500 μL 结晶紫染料染色 10 min,拍照计数。以相对细胞集落数作为纵坐标,用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制柱状图。

1.2.9 铜测定实验 超声破碎细胞离心后收集上清于冰上待测。96 孔板分为空白、标准、测定 3 组。各组加入 150 μL 试剂一,空白组加入 10 μL 双蒸水,标准组加入 10 μL 铜离子纯品,测定组加入 10 μL 待测样品,混匀后 37℃孵育 5 min,酶标仪测定 600 nm 吸光度值记录为 A1。各组加入 50 μL 试剂二,混匀后 37℃孵育 5 min,再次酶标仪测定波长 600 nm 吸光度值记录为 A2。根据 $\Delta A = A_2 - A_1$,铜离子浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$)=(Δ 测定 A 值- Δ 空白 A 值)/(Δ 标准 A 值- Δ 空白 A 值) \times 标准品浓度($\mu\text{mol}/\text{L}$),计算铜离子浓度。以相对铜离子浓度作为纵坐标,用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制柱状图。

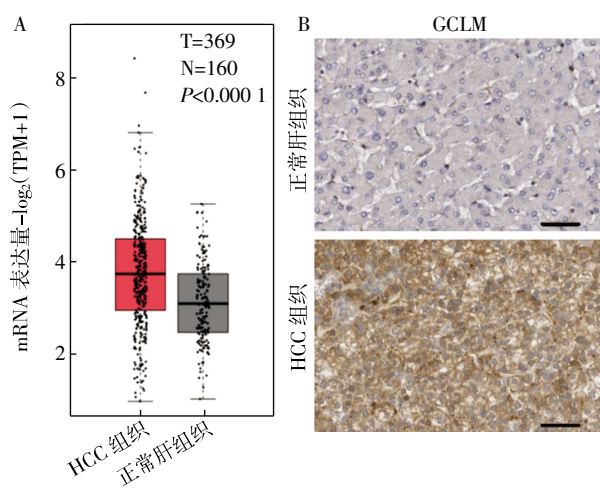
1.2.10 铜死亡激活实验 96 孔板每孔接种 2 500 个细胞,培养 24 h 后分别更换含 Elesclomol (20 nmol/L)、CuCl₂ (3 μmol/L)、Elesclomol (20 nmol/L) + CuCl₂ (3 μmol/L) 的 DMEM 完全培养基各 100 μL,继续培养 48 h。酶标仪测定 450 nm 处原始吸光度值,再根据相对吸光度=敲降组/未敲降对照组/未加药对照组,计算相对吸光度。分别以原始吸光度和相对吸光度作为纵坐标,用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制柱状图。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验、单因素方差分析或重复测量数据方差分析。计数资料用频数表示,比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库分析 HCC 组织中 GCLM 的表达情况 结果显示,与正常肝组织相比,HCC 组织中 GCLM mRNA ($P < 0.000 1$) (图 1A) 和蛋白表达水平升高 (图 1B)。

2.2 构建稳定敲降 GCLM 的 HCC 细胞株 与对照组相比,GCLM 敲降组细胞中 GCLM mRNA ($F = 255.20$, $P < 0.001$) (图 2A) 和蛋白表达水平下降 ($F = 50.77$,



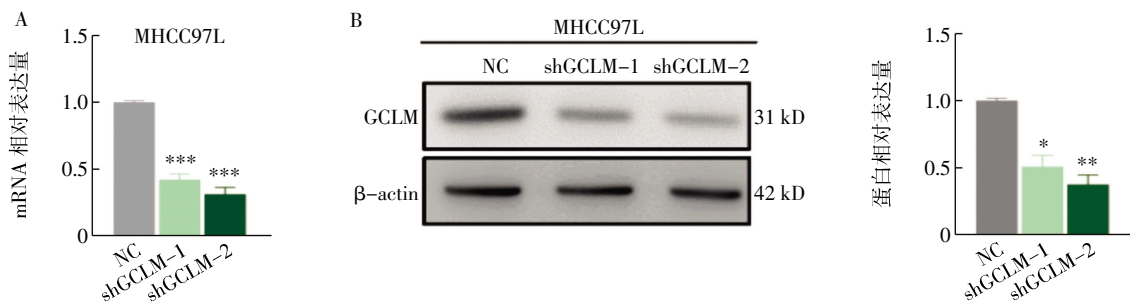
注:A:GEPIA 数据库分析 HCC 组织及正常组织中 GCLM 的 mRNA 表达情况;B:HPA 数据库分析 HCC 组织和正常组织中 GCLM 的免疫组化染色情况,标尺:50 μm;GCLM:γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶修饰亚基蛋白;HCC:肝细胞肝癌

图 1 HCC 组织中 GCLM 的表达情况

Fig.1 The levels of GCLM expression in HCC tissues

$P < 0.01$) (图 2B)。

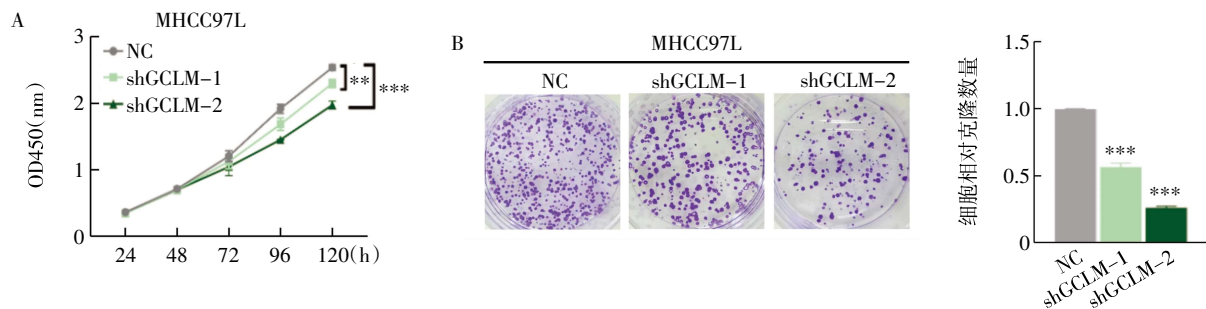
2.3 GCLM 对 HCC 细胞增殖的影响 与对照组相比,GCLM 敲降组细胞增殖活力下降 ($F = 131.70, 42.79$, 均 $P < 0.01$) (图 3A);同时,与对照组相比,GCLM 敲降组细胞克隆数量减少 ($F = 1 102, P < 0.001$) (图 3B)。



注:A:实时荧光定量 PCR 检测 GCLM mRNA 表达水平;B:Western 印迹检测 GCLM 蛋白表达水平;与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;NC:对照组;shGCLM-1/2:GCLM 敲降组;GCLM:γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶修饰亚基蛋白;β-actin:内参蛋白;HCC:肝细胞肝癌

图 2 HCC 细胞中 GCLM 稳定敲降的效率检测

Fig.2 The detection of stable knockdown efficiency of GCLM in HCC cell line



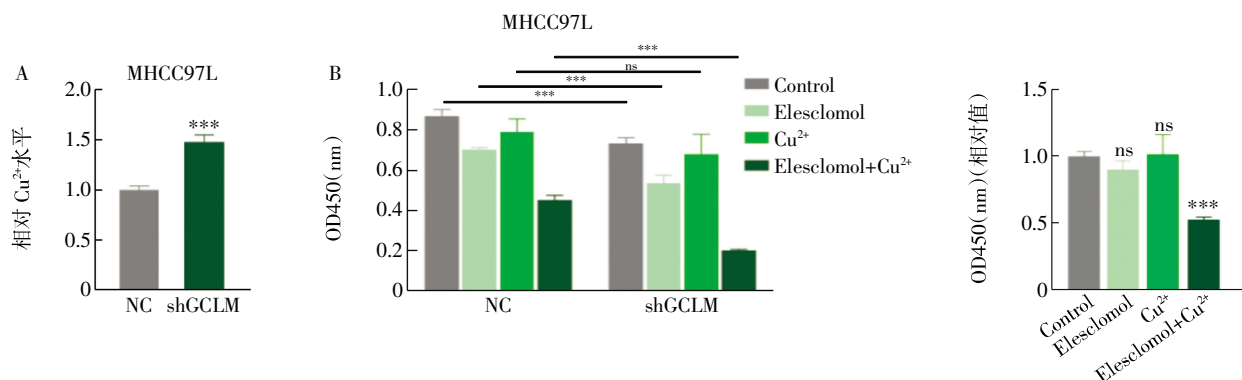
注:A:CCK-8 实验检测细胞增殖曲线;B:克隆形成实验检测细胞克隆数量;与对照组相比,* $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;NC:对照组;shGCLM-1/2:GCLM 敲降组;GCLM:γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶修饰亚基蛋白;HCC:肝细胞肝癌

图 3 GCLM 对 HCC 细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of GCLM on HCC cell proliferation

2.4 GCLM 对 HCC 细胞铜死亡的影响 实验结果显示,与对照组相比,GCLM 敲降组细胞铜离子含量明显升高($t=12.03, P<0.001$)(图 4A);与对照组相

比,联合用药组细胞增殖减少($F=46.42, P<0.001$),单独用药组细胞增殖影响不明显($F=2.17, P=0.17$)(图4B)。



注:A:细胞中相对 Cu^{2+} 含量;B:CCK-8 检测 20 nmol/L Elesclomol 和 (或) 3 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 处理后的细胞增殖情况;与对照组相比,*** $P<0.001$;NC:未敲降对照组;Control:未加药对照组;shGCLM:GCLM 敲降组;GCLM: γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶修饰亚基蛋白;HCC:肝细胞肝癌

图 4 GCLM 对 HCC 细胞铜死亡的影响

Fig.4 The effect of GCLM on HCC cell cuproptosis

3 讨论

HCC 的高复发率、高转移率和较差的预后是对 HCC 发生、发展机制认识不足的结果^[7]。HCC 的发生、发展涉及多个环节参与,如乙型肝炎病毒(HBV)感染等风险因素的影响、遗传与表观遗传学改变、氧化应激等代谢的异常改变^[8-10]。基因的表达改变与 HCC 的发生、发展密切相关,如原癌基因突变、驱动细胞增殖、自噬等基因的异常表达,这些基因的改变往往会导致控制细胞增殖、分化、转移等多种信号转导通路的异常激活^[11-13],进而调控 HCC 的发生、发展。

GCLM 本身没有酶活性,但能够通过降低 GCL 对谷氨酸的 K_m 值和提高 GSH 的 K_i 值来调节 GCL 的催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)对谷氨酸亲和性,从而调控细胞内 GSH 浓度,进而影响肿瘤细胞增殖^[14-15]。GCLM 的异常表达与多种肿瘤细胞的增殖密切相关。据报道,GCLM 在膀胱癌中高表达并与患者预后不良相关,并且 GCLM 可作为膀胱癌中的肿瘤启动子和免疫标志物,为膀胱癌提供潜在的治疗靶点^[16]。另外,GCLM 可通过促进中心体的扩增进而促进结肠癌的进展^[17]。以上研究均说明 GCLM 可通过多种途径影响多种肿瘤细胞增殖,而 GCLM 对 HCC 细胞增殖的调控有待阐明。因此,本研究首先探索了 GCLM 对 HCC 增殖的影响,结果显示,在 HCC 细胞中敲降 GCLM 能明显减弱细胞增殖,表明 GCLM 对 HCC 增殖有调控作用。

肿瘤细胞增殖受到多种细胞死亡形式调控,目

前传统的细胞死亡途径主要包括自噬依赖性细胞死亡、细胞凋亡、焦亡、铁死亡等^[18]。近年来,铜死亡的出现引起了广泛关注。铜是机体必需的微量元素,生理条件下正常细胞内铜浓度较低,铜浓度小幅度升高即可能引起细胞毒性,甚至导致细胞死亡^[19]。正常细胞内铜浓度通过活跃的稳态机制保持在极低的水平^[20],体内铜浓度对于维持机体内多种生命活动的代谢酶活性具有重要意义^[21]。肿瘤生长和转移过程中对铜的需求量更高^[22],而过量铜会诱导硫辛酰化二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT)的累积,该酶与线粒体三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环相关,导致蛋白毒性应激,并诱导肿瘤细胞铜死亡^[23]。据报道,GCLM 调控合成的 GSH 能够整合铜离子,抑制乳腺癌细胞的铜死亡^[24]。本研究结果发现,GCLM 敲降的 HCC 细胞中铜离子水平升高,提示 GCLM 敲降能够促进 HCC 细胞铜死亡。Tsvetkov 等^[23]报道,当 Elesclomol 和铜离子共同作用于肿瘤细胞时,Elesclomol 结合的铜离子与线粒体铁氧还蛋白 1 相互作用,被还原生成铜离子,铜离子水平升高直接与参与 TCA 循环的硫辛酰化蛋白结合,导致硫辛酰化蛋白聚集和 Fe-S 簇蛋白的不稳定,诱导蛋白毒性应激,激活肿瘤细胞铜死亡。本研究结果发现,GCLM 敲降能够进一步减弱 Elesclomol 和 CuCl_2 联合用药处理下的 HCC 细胞增殖,而分别单独用药时细胞增殖无明显变化,表明 GCLM 敲降可以通过促进铜死亡,进而减弱 HCC 细胞增殖。

综上所述,本研究表明了 GCLM 敲降通过促进

铜死亡来减弱 HCC 细胞增殖,为临床 HCC 的靶向治疗提供新思路。本研究存在不足之处,GCLM 调控 HCC 细胞铜死亡的潜在分子机制及相关的信号通路仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019,380(15):1450–1462.
- [2] SINGAL A G,LAMPERTICO P,NAHON P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: new trends[J]. *J Hepatol*, 2020,72(2):250–261.
- [3] MCGLYNN K A,PETRICK J L,EL-SERAG H B. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2021,73(Suppl 1):4–13.
- [4] KUDO M,FINN R S,QIN S,et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial[J]. *Lancet*, 2018,391(10126):1163–1173.
- [5] PINTO MARQUES H,GOMES DA SILVA S,DE MARTIN E,et al. Emerging biomarkers in HCC patients: current status [J]. *Int J Surg*, 2020,82(s):70–76.
- [6] HARRIS IS,TRELOAR A E,INOUE S,et al. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression[J]. *Cancer Cell*, 2015,27(2):211–222.
- [7] LLOVET J M,KELLEY R K,VILLANUEVA A,et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021,7(1):6–33.
- [8] WANG Y,DENG B. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism,targeted therapy, and biomarkers[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2023,42(3):629–652.
- [9] NAKAGAWA H,UMEMURA A,TANIGUCHI K,et al. ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development[J]. *Cancer Cell*, 2014,26(3):331–343.
- [10] AKINYEMIJU T,ABERA S,AHMED M,et al. The burden of primary liver cancer and underlying etiologies from 1990 to 2015 at the global,regional,and national level: results from the global burden of disease study 2015[J]. *Jama Oncol*, 2017,3(12):1683–1691.
- [11] SCHULZE K,IMBEAUD S,LETOUZÉ E,et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets[J]. *Nat Genet*, 2015,47(5):505–511.
- [12] GUICHARD C,AMADDEO G,IMBEAUD S,et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012,44(6):694–698.
- [13] LLOVET J M,ZUCMAN-ROSSI J,PIKARSKY E,et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016,2:16018–16069.
- [14] LU S C. Regulation of glutathione synthesis[J]. *Mol Aspects Med*, 2009,30(1–2):42–59.
- [15] BANSAL A,SIMON M C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance[J]. *J Cell Biol*, 2018,217(7):2291–2298.
- [16] WANG S,WANG H,ZHU S,et al. Systematical analysis of ferroptosis regulators and identification of gclm as a tumor promotor and immunological biomarker in bladder cancer[J]. *Front Oncol*, 2022,12:1040892–1040903.
- [17] HAN Y W,XU S X,ZHANG J,et al. Cadmium promotes the binding and centrosomal translocation of CCDC85C and PLK4 via ROS–GCLM pathway to trigger centrosome amplification in colon cancer cells[J]. *Toxicol Lett*, 2024,392:84–93.
- [18] PENG F,LIAO M,QIN R,et al. Regulated cell death(red) in cancer: key pathways and targeted therapies[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022,7(1):286–351.
- [19] CHEN L,MIN J,WANG F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022,7(1):378–394.
- [20] KIM B E,NEVITT T,THIELE D J. Mechanisms for copper acquisition,distribution and regulation[J]. *Nat Chem Biol*, 2008,4(3):176–185.
- [21] PIERSON H,YANG H,LUTSENKO S. Copper transport and disease: what can we learn from organoids?[J]. *Annu Rev Nutr*, 2019,39:75–94.
- [22] 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):102–113.
- [23] 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.
- [24] QIAO L,ZHU G,JIANG T,et al. Self-destructive copper carriers induce pyroptosis and cuproptosis for efficient tumor immunotherapy against dormant and recurrent tumors[J]. *Adv Mater*, 2024,36(8):e2308241.

(2024-01-03收稿)