

DOI: 10.13376/j.cbls/20240101

文章编号: 1004-0374(2024)08-1000-12

铜稳态、铜死亡与铜相关抗肿瘤药物研究进展

孔文哲, 路璐, 樊赛军*

(中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192)

摘要: 铜是人体必需的微量元素, 作为体内众多蛋白质和酶的辅因子, 铜参与多种生理活动, 铜过载与铜缺乏可导致多种疾病, 铜在肿瘤的稳态调节与肿瘤进展中也发挥了重要作用。铜在体内受到铜相关蛋白网络调节, 包括铜酶、铜伴侣蛋白和膜转运蛋白等, 这些蛋白质共同调节铜的摄入、排出和细胞内利用, 从而维持机体铜稳态。铜死亡是一种由线粒体内过量铜离子诱发, 靶向三羧酸循环的细胞死亡形式, 以线粒体硫辛酰化蛋白聚集和铁硫簇蛋白丢失为特征, 铜死亡的发现为包括肿瘤在内的疾病治疗提供了新的研究方向。靶向铜是目前肿瘤研究的方向之一, 包括使用铜离子载体提高细胞内铜含量来诱导氧化应激与铜死亡, 或使用铜离子螯合剂降低铜的生物利用度。本文综述了铜稳态、铜死亡以及铜相关抗肿瘤药物的最新研究进展, 以期以为铜死亡为靶点的肿瘤治疗提供参考。

关键词: 铜稳态; 铜死亡; 肿瘤; 铜离子载体; 铜离子螯合剂

中图分类号: Q946.5; Q591.4

文献标志码: A

Progress in copper homeostasis, cuproptosis, and copper-related antitumor drugs

KONG Wen-Zhe, LU Lu, FAN Sai-Jun*

(Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract: Copper is an essential trace metal element for human body. As a cofactor for numerous proteins and enzymes in the organism, copper is involved in a variety of physiological activities. Copper also plays an important role in the regulation of tumor homeostasis and progression. Copper overload and copper deficiency can lead to many diseases, such as Menke's disease and Wilson's disease. Thus, copper is regulated by a network of copper-related proteins, including copper enzymes, copper chaperonins, and membrane transport proteins. These proteins maintain copper homeostasis by regulating copper intake, export and intracellular utilization. Cuproptosis is a novel form of cell death induced by excessive copper ions in the mitochondria. It is characterized by the accumulation of mitochondrial lipoacylated proteins and the loss of iron-sulfur cluster proteins. The discovery of cuproptosis provides a new method for the treatment of diseases, including tumours. Targeting copper is one of the current hotspots in tumor research, including the use of copper ionophores to increase intracellular copper content to induce oxidative stress and cuproptosis, and the use of copper ion chelators to reduce the bioavailability of copper. In this paper, we conducted a systematic review on copper homeostasis, cuproptosis and copper-related antitumor drugs, in order to provide reference for the study of cancer treatment by targeting cuproptosis.

Key words: copper homeostasis; cuproptosis; cancer; copper ionophore; copper chelator

收稿日期: 2024-03-11; 修回日期: 2024-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(82273577)

*通信作者: E-mail: fansaijun@irm-cams.ac.cn; Tel: 022-85685301

铜是人体必需的微量元素, 主要通过食物和饮水摄入。铜是体内众多蛋白质和酶的辅因子, 参与抗氧化防御系统的构成、神经肽的合成和免疫功能的维持等^[1]。铜摄入不足可导致贫血、消瘦等症状, 铜摄入过量可引起急、慢性中毒, 严重者可致死亡, 体内铜代谢障碍可引发 Menke's 病与 Wilson's 病^[2]。体内铜的摄入、排出和细胞内利用受到复杂的铜相关蛋白网络调节, 并维持在相对稳定的状态^[3]。铜死亡是一种由线粒体内过量铜离子诱发, 靶向三羧酸循环的细胞死亡形式, 以线粒体硫辛酰化蛋白聚集和铁硫簇蛋白丢失为特征^[4], 铜死亡的发现为包括肿瘤在内的疾病治疗提供了新的研究方向。靶向铜是目前肿瘤研究的方向之一, 包括使用铜离子载体(如双硫仑、伊利司莫等)提高细胞内铜含量, 以诱导氧化应激与铜死亡, 或使用铜离子螯合剂(如四硫钼酸盐等)降低铜的生物利用度。本文综述了铜稳态、铜死亡以及铜相关抗肿瘤药物相关的最新研究进展, 以期为以铜死亡为靶点的肿瘤治疗提供参考。

1 铜稳态与铜代谢

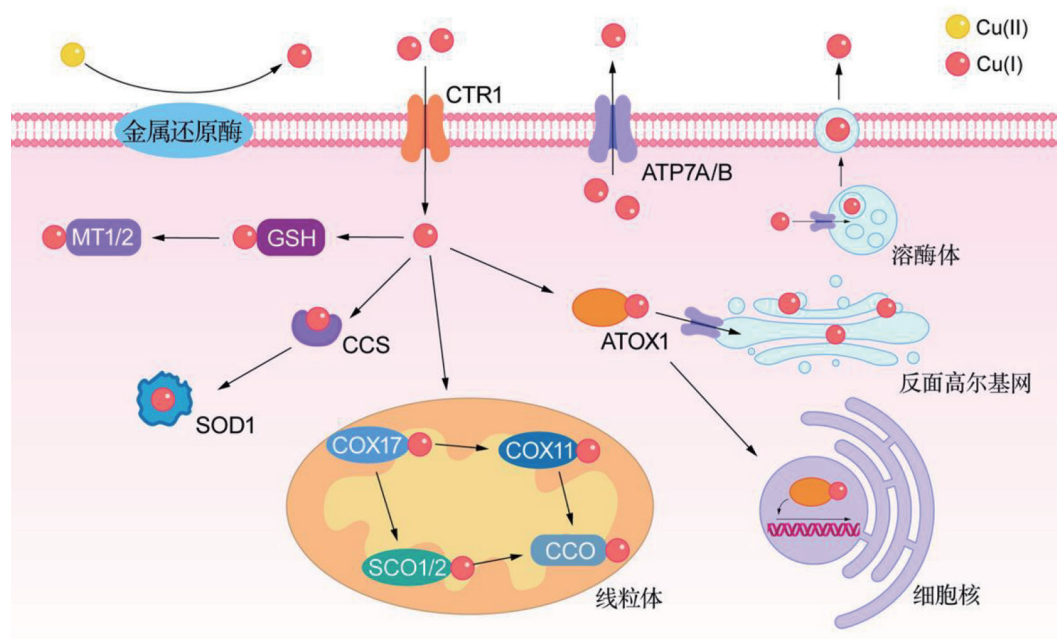
铜富含于多种食物之中, 如动物内脏、海鲜、谷类以及蔬菜水果等, 饮用水也是体内铜的重要来源, 目前推荐的成人每日铜摄入量为 2~3 mg^[5]。虽然铜是人体必需的元素, 但过量铜可通过芬顿反应($\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$)产生羟自由基($\cdot\text{OH}$), $\cdot\text{OH}$ 是一种重要的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 可破坏 DNA、蛋白质和脂质等进而诱导细胞毒性^[6]。因此, 铜受到体内复杂的铜相关蛋白网络调节, 包括铜酶、铜伴侣蛋白和膜转运蛋白等, 这些蛋白共同调节铜的摄入、排出和细胞内利用, 从而维持机体铜稳态^[3]。人体内游离铜水平较低, 多数铜通过与蛋白质或其他分子结合, 以结合铜形式储存或参与生化反应^[7]。

摄入的铜主要通过肠上皮进行吸收, 十二指肠是主要的吸收部位^[8]。膳食中的铜多以氧化形式的 Cu^{2+} 存在, 但只有 Cu^+ 可以被机体吸收和利用, 因此, 如图 1 所示, 摄入的 Cu^{2+} 首先由六跨膜前列腺上皮抗原或十二指肠细胞色素 b 等金属还原酶转换为 Cu^+ , 随后通过铜转运蛋白 1 (copper transporter 1, CTR1) 介导进入肠细胞^[9-10]。CTR1 是肠道吸收铜的主要因子, 特异性敲除肠道 CTR1 可致使外周组织出现铜缺乏^[11]。CTR1 表达水平与体内铜含量相关, 铜过量时表达下调, 铜缺乏时则上调^[12]。低亲

和力的铜转运蛋白 2 (CTR2)^[13]、二价金属转运蛋白 1 (DMT1)^[14] 等也参与铜的摄入。

被吸收的铜通过肠上皮细胞基底外侧膜的 ATP7A 释放入血^[15]。在血中, 除小部分与白蛋白、转铁蛋白和游离氨基酸结合外, 大部分铜与铜蓝蛋白结合^[16], 并通过门静脉系统转运至肝脏。肝细胞通过 CTR1 摄取铜, 肝脏是铜储存与排泄的主要器官^[17]。如图 1 所示, 在细胞质中, 铜可与谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合并被转移至金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 中, GSH 与 MT 均富含巯基, 因此对铜有很高的亲和力, 肝脏 MT1 和 MT2 是铜的主要储存位点^[18]。主要在中枢神经系统中表达的 MT3 也参与铜稳态调节^[19]。在肝细胞内, 铜也参与铜蓝蛋白的合成, 结合铜的铜蓝蛋白被释放入血, 并被转运到特定组织或器官中参与催化多种生理反应^[7]。当体内铜含量超过正常阈值时, 肝细胞可通过 ATP7B 将铜转运至胆汁, 随后胆汁通过胆管被排入肠道, 最后通过粪便排出体外, 胆汁排泄是机体排出铜的主要途径^[2]。综上所述, 系统性的铜代谢主要通过小肠吸收和肝脏排泄来调节, 铜过量时吸收减少而排泄增加, 铜缺乏时则相反。

在细胞内, 铜主要以 Cu^+ 形式参与生理反应, CTR1 是细胞摄入铜的主要途径^[20]。如图 1 所示, 进入细胞后, 铜可结合多种铜分子伴侣, 如细胞色素 C 氧化酶铜伴侣 11/17 (cytochrome c oxidase copper chaperone 11/17, COX11/17)、超氧化物歧化酶铜伴侣 (copper chaperone for superoxide dismutase, CCS)、抗氧化蛋白 1 (antioxidant protein 1, ATOX1) 等, 进而被递送至特定的蛋白质或细胞区室发挥作用。ATOX1 可将铜转运到位于反面高尔基网 (trans-golgi network, TGN) 或细胞膜上的 ATP7A/B^[21]。TGN 中的 ATP7A/B 可促进赖氨酰氧化酶、酪氨酸酶和铜蓝蛋白等铜相关酶的合成^[22]; 而细胞膜上的 ATP7A/B 则负责将铜排出细胞。在细胞核中, ATOX1 可与铜结合进而充当转录因子, 驱动基因表达^[23], 缺乏 ATOX1 编码基因的小鼠会因铜稳态失衡而在围产期死亡^[24]。超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 又被称为铜锌超氧化物歧化酶, 可催化超氧自由基阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 生成过氧化氢 ($2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD1}} \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)^[25], $\text{O}_2^{\cdot-}$ 参与体内 ROS 的生成。CCS 能够与 CTR1 和 SOD1 结合进而形成 CTR1-CCS-SOD1 复合体, 该复合体可将铜转移至 SOD1 从而激活 SOD1, 进而调节细胞内氧化应激^[26]。此外, 铜还参与线粒体内细胞色素



细胞外的 Cu^{2+} 被金属还原酶还原为 Cu^+ ，随后通过铜转运蛋白1 (copper transporter 1, CTR1)进入细胞。在细胞内，铜可被储存于金属硫蛋白1/2 (metallothionein 1/2, MT1/2)中，或与多种铜分子伴侣结合进而被递送至特定的蛋白质或细胞区室发挥作用。过量的铜可通过胞吐或铜转运ATP酶A/B (copper transporting ATPase 7A/B, ATP7A/B)排出细胞。GSH，谷胱甘肽；CCS，超氧化物歧化酶铜伴侣；SOD1，超氧化物歧化酶1；COX17，细胞色素C氧化酶铜伴侣17；COX11，细胞色素C氧化酶铜伴侣11；SCO1/2，细胞色素C氧化酶合成物1/2；CCO，细胞色素C氧化酶；ATOX1，抗氧化蛋白1。

图1 细胞铜代谢示意图

C氧化酶 (cytochrome c oxidase, CCO) 的合成。在人类中，CCO包含两个核心亚基COX1和COX2 (cytochrome c oxidase subunit 1/2)，它们分别在 Cu_B 和 Cu_A 位点与铜结合^[27]。COX17将铜从细胞质转运到线粒体膜间隙^[28]，随后铜通过细胞色素C氧化酶合成物1/2 (synthesis of cytochrome c oxidase 1/2, SCO1/2)转移到COX2亚基，或通过COX11转移到COX1亚基^[29-30]，进而参与呼吸链电子传递与氧化磷酸化过程。COX17、SCO1/2突变会导致CCO活性降低并影响机体能量代谢^[31-32]。

如图1所示，ATP7A/B是铜排出细胞的主要转运体，其定位和功能处于动态调节之中^[33]：当细胞内铜离子处于生理水平时，这些转运体位于TGN中，它们将铜离子从细胞质泵入TGN腔内；当细胞内铜增加时，这些转运体从TGN转移到质膜上进而将铜排出细胞。ATP7A和ATP7B具有不同的表达模式，前者在大多数组织或器官中表达，而后者主要在肝脏表达^[22]。肠上皮细胞也表达ATP7B，主要负责在细胞内的囊泡中储存铜，以维持细胞内的铜稳态^[34]。当过量的铜进入肝细胞时，ATP7B可从TGN转移到溶酶体进而通过胞吐将铜排入胆

汁^[35]；此外，转移到顶端膜上的ATP7B也可直接将铜排入胆汁^[36]。因此，ATP7A和ATP7B突变易导致铜代谢紊乱，使铜在细胞内蓄积，从而导致Menke's病和Wilson's病的发生^[2,35]。

2 铜死亡及其机制

铜死亡是最新发现的一种铜依赖的细胞死亡形式。铜离子可通过凋亡、Caspase非依赖性细胞死亡、氧化应激、自噬和铁死亡等途径诱导细胞死亡^[37]。2022年，*Science*杂志报道，细胞内过量的铜离子诱导了一种全新的调节性细胞死亡形式，以硫辛酰化蛋白聚集和铁硫簇蛋白丢失为特征^[4]。

Tsvetkov等^[4]发现，铜离子载体伊利司莫 (elesclomol, ES)联合 Cu^{2+} 可提高细胞内的铜离子水平并诱导细胞死亡，而单独使用ES则没有效果。ES-Cu诱导的细胞死亡不涉及凋亡标志物Caspase-3的切割或激活，敲除凋亡效应因子BAX和BAK1或通过抑制已知的细胞死亡途径(如坏死性凋亡、铁死亡和氧化应激等)均未能缓解ES-Cu诱导的细胞死亡，只有铜离子螯合剂四硫钼酸盐 (tetrathiomolybdate, TTM, $[\text{MoS}_4^{2-}]$)可以抑制细胞死

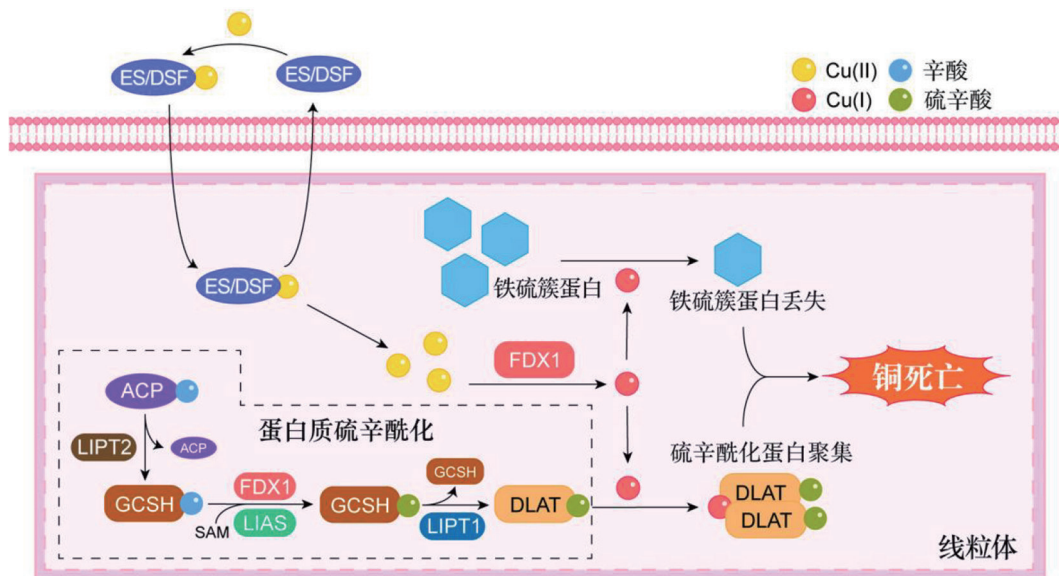
亡, 表明铜死亡不同于已知的其他细胞死亡形式^[4]。

既往研究表明, 铜可通过诱导线粒体氧化损伤或破坏三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 相关酶进而导致细胞死亡^[38], 但具体机制尚未明确。与之类似, Tsvetkov 等^[4]发现: 高度依赖线粒体呼吸的细胞对铜诱导的细胞死亡更加敏感, 缺氧环境或使用电子传递链复合物抑制剂、丙酮酸摄取抑制剂或线粒体功能抑制剂均可缓解铜诱导的细胞死亡; 细胞耗氧率测定结果显示 ES-Cu 导致细胞备用呼吸能力明显降低, 而基础呼吸与 ATP 相关呼吸并未明显减弱, 证明铜直接作用于 TCA 循环而不是电子传递链或 ATP 合成。此外, 经 ES-Cu 处理的细胞, 其 TCA 循环相关代谢产物含量发生明显改变, 进一步表明铜死亡与 TCA 循环密切相关^[4]。

随后, Tsvetkov 等^[4]通过全基因组 CRISPR-Cas9 筛选确定了促进铜死亡的 7 个关键基因, 如表 1 所示, 包括 FDX1、LIAS、LIPT1、DLAT、DLD、PDHA1 和 PDHB, 这些基因均与硫辛酸通路相关, 参与线粒体蛋白质的硫辛酰化过程^[4]。硫辛酰化是激活多种线粒体酶复合体所必需的, 如图 2 所示, 人体内硫辛酸的生物合成包含多个步骤: 酰基载体蛋白 (acyl-carrier protein, ACP) 上的酰基链通过延伸、还原和脱水过程生成辛酰 ACP; 硫辛酰转移酶 2 (lipolytransferase 2, LIPT2) 将辛酰基部分从 ACP

转移到甘氨酸裂解系统 H 蛋白 (glycine cleavage system H protein, GCSH) 上; LIAS 通过消耗 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM), 在辛酰基的 6 号和 8 号碳上插入硫原子, 进而完成 GCSH 上硫辛酸的合成; 最后, LIPT1 将硫辛酰部分从 GCSH 转移到靶蛋白 (如 DLAT、DLST 等) 上, 进而完成线粒体蛋白的硫辛酰化^[39-40]。哺乳动物细胞内已发现的硫辛酰化蛋白大多与 TCA 循环相关^[41]。单独敲除 FDX1 或 LIAS 均可缓解 ES-Cu 诱导的细胞死亡, 而 FDX1 与人类肿瘤样本的硫辛酰化蛋白水平高度相关, 并且 FDX1 的缺失会导致蛋白质硫辛酰化的完全丧失, 因此, FDX1 可能是硫辛酰化的上游调节因子^[4]。后续研究证实, FDX1 直接结合 LIAS, 并作为电子供体, 参与 LIAS 介导的蛋白质硫辛酰化反应^[42]。FDX1 也是 ES 作用的直接靶点, 可将 ES 携带的 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , Cu^+ 通过直接与硫辛酰化的 DLAT 结合, 导致 DLAT 的聚集和功能丧失^[4,43]。

铜死亡也涉及线粒体铁硫簇蛋白的破坏。铁硫簇是线粒体呼吸酶的重要辅因子, 铜可抑制铁硫簇的形成并阻碍线粒体铁硫簇蛋白的组装^[44]。在酿酒酵母中, 过量铜会破坏线粒体铁氧还原蛋白 Yah1 的 Fe-S 结构域^[45], 导致结合铁硫簇的核糖体生物合成蛋白 Rli1 失活^[46], 进而阻碍铁硫簇合成。线



铜离子载体将 Cu^{2+} 载入细胞线粒体内, 随后 Cu^{2+} 被铁氧还原蛋白 1 (ferredoxin 1, FDX1) 还原为 Cu^+ , 诱导铁硫簇蛋白丢失与硫辛酰化蛋白聚集, 进而引发细胞死亡。ES, 伊利司莫; DSF, 双硫仑; ACP, 酰基载体蛋白; LIPT2, 硫辛酰转移酶 2; GCSH, 甘氨酸裂解系统 H 蛋白; LIAS, 硫辛酰合成酶; SAM, S-腺苷甲硫氨酸; LIPT1, 硫辛酰转移酶 1; DLAT, 二氢脂酰 S-乙酰基转移酶。

图2 铜死亡示意图

表1 促进铜死亡的相关基因^[4]

基因	基因全称		功能
FDX1	ferredoxin 1	铁氧还原蛋白1	将Cu ²⁺ 还原为Cu ⁺ ; 参与蛋白质硫辛酰化过程
LIPT1	lipolytransferase 1	硫辛酸转移酶1	参与蛋白质硫辛酰化过程
LIAS	lipoyl synthase	硫辛酸合成酶	
DLD	dihyrolipoamide dehydrogenase	二氢硫辛酰胺脱氢酶	丙酮酸脱氢酶复合体组分
PDHA1	pyruvate dehydrogenase E1 subunit α 1	丙酮酸脱氢酶E1亚单位 α 1	
PDHB	pyruvate dehydrogenase E1 subunit β	丙酮酸脱氢酶E1亚单位 β	
DLAT	dihyrolipoamide S-acetyltransferase	二氢脂酰胺S-乙酰基转移酶	

粒体 ABC 转运蛋白 ATM1 缺失能增强铜对铁硫簇合成的抑制作用^[47]。Tsvetkov 等^[4]发现, 细胞经铜离子载体处理后同样出现了铁硫簇蛋白的破坏。铁硫簇与线粒体蛋白硫辛酰化也具有密切联系, 硫辛酸合成时所需的硫需要 LIAS 的铁硫簇提供, 铁硫簇的破坏可能会影响蛋白质硫辛酰化过程^[42]。综上所述, 如图 2 所示, 铜死亡可总结为细胞内过量的铜离子诱导线粒体硫辛酰化蛋白的聚集和铁硫簇蛋白的破坏, 触发蛋白毒性应激并最终导致细胞死亡。

3 铜相关抗肿瘤药物

铜在肿瘤的稳态调节及肿瘤进展中发挥重要作用, 与正常组织相比, 肿瘤对铜的需求更高^[48]。临床研究显示, 相较于健康人群, 癌症患者的血清或肿瘤组织中铜离子水平显著升高, 较高的铜离子水平往往代表较差的临床分期及预后^[49-50]。铜可提高基因组不稳定性、促进血管生成和上调促肿瘤信号通路, 进而增强肿瘤的转移性和侵袭力^[51]。虽然铜有利于肿瘤的增殖与转移, 但过量的铜离子已被证明通过凋亡或氧化应激等途径诱导肿瘤细胞死亡, 最新发现的铜死亡也为肿瘤治疗提供了新的潜在靶点。铜相关抗肿瘤药物是目前肿瘤研究的热点之一, 针对铜的肿瘤治疗方案包括使用铜离子螯合剂降低铜的生物利用度, 或使用铜离子载体提高肿瘤细胞内的铜含量。

3.1 铜离子载体

铜离子载体是一种脂溶性分子, 与 Cu²⁺ 可逆结合, 可跨膜转运铜离子, 在铜死亡中发挥了重要作用, 有望作为全新的抗肿瘤药物用于临床治疗。双硫仑 (disulfiram, DSF) 与伊利司莫 (ES) 是目前研究较为深入的两种铜离子载体, 可将 Cu²⁺ 转运至细胞或线粒体内以诱导铜依赖的细胞死亡。

3.1.1 双硫仑

双硫仑是一种乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydro-

genase, ALDH) 抑制剂, 于上世纪被美国 FDA 批准用于治疗酒精成瘾, 药代动力学研究广泛, 价格低廉且具有良好的安全性与耐受性^[52]。DSF 在体内可被还原为二乙基二硫代氨基甲酸酯 (diethyldithiocarbamate, DTC), 作为 DSF 的活性形式, DTC 可与 Cu²⁺ 结合形成络合物 CuET (DSF-copper complex) 进而发挥抗癌作用^[53]。DSF 联合铜可通过多种途径发挥抗肿瘤活性, 包括抑制泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin proteasome pathway, UPS)、调节核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 通路、促进 ROS 积累、抑制肿瘤干细胞形成和铜死亡等。

DSF-Cu 可通过抑制蛋白酶体活性进而发挥抗癌作用。p97/VCP (valosin-containing protein) 是 UPS 的重要分离酶, Skrott 等^[54]证明, DSF-Cu 可靶向 p97/VCP 分离酶的接头蛋白核定位蛋白 4 (nuclear protein localization protein 4, NPL4) 并诱导其聚集, 进而失活 p97-NPL4-UFD1 通路, 干扰蛋白质降解机制, 引发热休克反应和细胞死亡。分子机制研究证实, DSF-Cu 通过抑制 p97-NPL4-UFD1 复合体的构象改变进而抑制 UPS 功能^[55]。

肿瘤启动细胞 (tumor-initiating cell, TIC) 或肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 的形成与增殖是化疗耐药、辐射抵抗与肿瘤复发的重要因素。研究发现, DSF-Cu 可通过抑制 UPS 活性, 逆转辐射诱导的 NF- κ B 表达上调, 进而抑制下游干性基因 ERBB2、SOX9 和 MYC 的表达, 阻碍辐射诱导的乳腺癌干细胞 (breast cancer stem cell, BCSC) 形成^[56]。此外, DSF-Cu 还可通过激活 IRE1 α -XBP1 通路增强辐射诱导的免疫原性细胞死亡^[57], 提高 BCSC 的辐射敏感性。Liu 等^[58]发现, DSF-Cu 可消除乳腺癌耐药细胞系 MDA-MB-231_{PAC10} 的 CSC 特性, 逆转对抗肿瘤药物紫杉醇和顺铂的抗性, 提高化疗疗效。DSF-Cu 与 PI3K 抑制剂 BKM120 联合使用可降低乳腺癌细胞中 ALDH⁺ 和 CD44⁺/CD24⁻ TIC 数量并

提高 TIC 的凋亡水平^[59]。ALDH 活性升高是 CSC 的标志之一, 因此 DSF-Cu 的抗癌活性常被归因于对 ALDH 的抑制^[60]。然而, 2019 年的研究显示, DSF-Cu 的活性形式 CuET 并不能抑制 ALDH 活性, 单独抑制 ALDH 也不会影响肿瘤细胞活力^[61], 这些不同结论的结果仍待进一步深入探索。

除作用于 TIC 与 CSC 外, DSF-Cu 还可通过促进 ROS 积累或细胞周期阻滞等机制发挥抗癌作用。DSF-Cu 可通过提高 ROS 水平进而激活 MAPK 信号通路导致鼻咽癌细胞凋亡, p53 介导的铁死亡也参与其中^[62]。DSF-Cu 也可通过激活 ROS-JNK 通路以及抑制 NF- κ B 和 Nrf2 通路进而发挥抗白血病作用^[63]。此外, DSF-Cu 可促进抑癌基因 PTEN 和 FoxOs 的表达并抑制癌基因 MYC 的表达, 进而诱导急性髓细胞性白血病细胞 G₀/G₁ 期阻滞和凋亡^[64]。DSF-Cu 还能破坏 DNA 修复途径, 增强化疗药物替莫唑胺和 γ 辐射对胶质母细胞瘤的治疗效果^[65]。临床研究表明, DSF-Cu 联合替莫唑胺可提高胶质瘤患者的无进展生存期^[66]。与确诊癌症后停用 DSF 的患者相比, 继续服用 DSF 患者的癌症死亡率显著降低^[54]。

铜死亡为肿瘤治疗提供了新的方向, 最新的研究发现 DSF-Cu 可诱导多种肿瘤发生铜死亡^[67-68]。DSF-Cu 全身给药可能对正常组织造成损伤, 因此, 如何增强其靶向性是当前研究的热点。Zhou 等^[69]通过构建光热触发纳米平台 Au@MSN-Cu/PEG/DSF, 将 DSF 与 Cu²⁺ 靶向递送至肿瘤组织, 释放后二者原位结合并产生毒性更强的 Cu⁺, 促进硫辛酰化线粒体蛋白聚集并诱导肿瘤细胞死亡。DSF-Cu 会增加肿瘤中程序性死亡配体 1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 的表达, 诱导肿瘤细胞免疫逃逸, 因此联合 PD-L1 抑制剂可增强 DSF-Cu 诱导的肺癌细胞铜死亡^[70]。Liu 等^[71]构建了一种 CuX-P 体系, 该体系被过表达程序性死亡受体 1 的 T 细胞膜包裹, 内含负载 DSF-Cu 的 MXene 纳米片。CuX-P 识别并黏附于肿瘤细胞表面的 PD-L1, 随后被肿瘤细胞内吞, 增加细胞内 DSF-Cu 含量并促进 PD-L1 表达, 在肿瘤表面补充的 PD-L1 再次结合并内化 CuX-P, 不断消耗肿瘤表面的 PD-L1 并促进 CuX-P 在肿瘤内的富集, 从而靶向诱导乳腺癌细胞铜死亡。

3.1.2 伊利司莫(ES)

ES 是一种新型铜离子载体。电化学研究表明, ES 可与 Cu²⁺ 按 1:1 比例结合形成络合物^[72]。该络

合物将 Cu²⁺ 转运至线粒体内, 并在 Cu²⁺ 被 FDX1 还原为 Cu⁺ 后释放 Cu⁺, 随后 ES 从细胞排出并继续转运 Cu²⁺ 至线粒体内, 不同于 DSF, ES 对线粒体具有高度选择性^[73]。

ES 最初被发现可用于增强紫杉醇的抗肿瘤活性^[74], 进而提高对难治性实体瘤和 IV 期转移性黑色素瘤患者的疗效^[75]。长期以来, ES 的抗癌作用被认为与线粒体氧化应激相关。Nagai 等^[73]发现, ES 通过转运铜至线粒体内促进 ROS 积累, 进而抑制肿瘤增殖。在人白血病 K562 细胞中, 铜离子可被 ES 转运至细胞内, 氧化抗坏血酸并与过氧化氢反应产生大量 ROS^[76]; 此外, ES-Cu 还可将细胞周期阻滞在 G₁ 期, 损伤 DNA 并破坏线粒体膜电位, 进而发挥细胞毒性作用^[77]。葡萄膜黑色素瘤是一种预后较差的恶性眼内肿瘤, 以 GNAQ 和 GNA11 基因突变为特征, ES-Cu 可通过诱导 ROS 产生, 选择性激活大肿瘤抑制激酶 1, 促进 Yes 相关蛋白磷酸化并抑制其核内积累, 导致癌基因 SNAI2 表达下调, 从而抑制 GNAQ/11 突变型黑色素瘤细胞的生长与转移^[78]。

CSC 与 TIC 同样是 ES-Cu 的作用靶点。Buccarelli 等^[79]发现, ES-Cu 可诱导胶质母细胞瘤干细胞样细胞线粒体内 ROS 的快速积累并诱导细胞死亡, 增强替莫唑胺的体内活性。Harrington 等^[80]发现, ES-Cu 可促进 TIC 中 ROS 积累并诱导氧化应激, 增强化疗药物卡铂的抗肿瘤活性, 抑制卵巢癌复发。有研究者认为, ES-Cu 诱导的 ROS 产生和细胞毒性可能部分归因于线粒体氧化磷酸化的解耦联或电子传递链活性的抑制^[81]。ES-Cu 的抗癌机制也涉及铁死亡, Gao 等^[82]发现, ES 可促进结直肠癌细胞中 ATP7A 的降解, 加剧线粒体内铜离子滞留, 诱导 ROS 积累与氧化应激; 此外, ES 还可通过促进溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 的降解来抑制 GSH 合成, 从而诱导细胞铁死亡。

2022 年, Tsvetkov 等^[4]证明 ES-Cu 诱导的铜死亡是一种全新的细胞死亡形式, 进一步阐明了 ES 的抗癌机制。母系胚胎亮氨酸拉链激酶 (MELK) 通过激活 PI3K/mTOR 信号通路, 提高 DLAT 表达水平, 加剧肝细胞癌进展, ES-Cu 可逆转这一过程, 诱导肝癌细胞铜死亡^[83]。铜死亡与 RNA 修饰密切相关, Sun 等^[84]发现, 甲基转移酶样蛋白 16 (methyltransferase-like protein 16, METTL16) 通过对 FDX1 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰来介导 ES-Cu 诱导的胃癌细胞铜死亡, METTL16 乳酸化水平升高可加剧

这一过程。肿瘤组织主要通过有氧糖酵解获得能量,当糖酵解受到抑制,如加入半乳糖或2-脱氧葡萄糖时^[4,85],TCA循环活性可出现代偿性增加,进而增强ES-Cu的抗肿瘤活性。衣康酸4-辛酯可降低糖酵解酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性,抑制结肠癌细胞有氧糖酵解,增强ES-Cu诱导的铜死亡^[85]。铁死亡激动剂Sorafenib和Erastin可通过抑制线粒体基质相关蛋白酶介导的FDX1降解来上调蛋白质硫辛酰化水平,并抑制肝癌细胞内GSH的合成,增强ES-Cu诱导的肝癌细胞铜死亡^[86]。这些研究结果提示靶向铜死亡可能是一种新的肿瘤治疗策略。III期临床试验显示,ES在低水平血清LDH患者中的疗效要显著优于高水平血清LDH患者,提示血清LDH水平可能作为ES的用药标志^[87]。

虽然ES在临床试验中展现出较好的安全性,但较低的血浆半衰期和表观分布容积导致到达肿瘤组织的ES十分有限^[6]。此外,ES-Cu也可在体外诱导正常细胞发生铜死亡^[88]。因此,提高其靶向性十分关键。Wu等^[89]设计了一种ROS响应性聚合物ECPCP,内含肉桂醛(cinnamaldehyde,CA)与ES-Cu,该聚合物可提高ES的体循环时间并靶向肿瘤组织,肿瘤细胞内较高水平的ROS触发CA与ES-Cu的释放,CA可进一步增加细胞内ROS水平进而促进ES-Cu的释放,从而加速诱导乳腺癌细胞铜死亡。Guo等^[90]设计了一种ROS敏感的纳米粒子NP@ESCu,可将ES与Cu²⁺递送至肿瘤细胞并在ROS触发下释放ES与Cu²⁺,除诱导线粒体损伤与铜死亡外,NP@ESCu还可诱导肿瘤微环境中巨噬细胞由M2型向M1型复极化,抑制肿瘤免疫逃逸;此外,NP@ESCu可通过上调膀胱癌细胞膜上PD-L1的表达增强免疫治疗药物 α PD-L1疗效。细胞内的PD-L1可通过促进DNA修复等途径介导肿瘤细胞放疗抵抗,为此,Shen等^[91]开发了一种海藻酸钠水凝胶,可携带ES-Cu与半乳糖进入肿瘤细胞,除提高结肠癌细胞TCA循环活性并诱导铜死亡外,还可抑制辐射诱导的细胞内PD-L1上调,提高放射免疫治疗疗效。

3.2 铜离子螯合剂

铜离子螯合剂可直接结合铜离子,降低肿瘤细胞内铜含量从而发挥抗癌作用。研究较为广泛的铜螯合剂包括青霉胺、曲恩汀和TTM等。青霉胺和曲恩汀是最早的一批铜螯合剂,用于治疗Wilson's病。研究显示,它们可通过耗竭铜离子抑制肿瘤血管生成,发挥抗癌作用。青霉胺可抑制赖氨酰氧化

酶(lysyl oxidase, LOX)活性,降低血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平,抑制肿瘤血管生成,减缓胶质母细胞瘤进展^[92]。曲恩汀可通过降低白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)和血小板-内皮细胞黏附分子CD31的表达,抑制内皮细胞增殖与肿瘤血管生成,减缓异种移植瘤生长^[93-94]。在间皮瘤小鼠模型中,曲恩汀和青霉胺均可抑制肿瘤血管生成并阻碍肿瘤生长,虽然曲恩汀的铜螯合能力低于青霉胺,但它具有更好的耐受性^[95]。

四硫钼酸盐是一种高度特异的新型铜离子螯合剂,可与铜离子结合形成不溶性的铜-钼-硫团簇^[96]。TTM主要通过耗竭铜进而发挥抗肿瘤作用。BRAF是位于7号染色体的原癌基因,BRAF^{V600E}是最常见的突变类型,可引起MAPK通路持续异常激活,促进肿瘤进展,铜作为辅因子可加剧这一过程^[97]。研究显示,TTM可增强BRAF^{V600E}与丝裂原活化蛋白激酶1/2抑制剂的抗肿瘤活性,抑制耐药黑色素瘤细胞的转化生长^[97],并减缓BRAF^{V600E}异种移植瘤进展^[98],TTM在携带BRAF^{V600E}突变的结肠癌中也发挥了相似作用^[99]。

TTM可通过耗竭铜进而抑制肿瘤血管生成。在RIP1-Tag2小鼠模型中,TTM可抑制癌前病变中的血管生成,减缓胰腺癌进展^[100]。TTM也可降低乳腺癌中NF- κ B的转录活性,抑制下游VEGF、IL-1 α 和IL-8的产生和分泌^[101]。此外,TTM还可以促进缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的降解并减少促血管生成因子的表达^[102]。

TTM可通过耗竭铜发挥化疗增敏作用。顺铂是化疗常用药物,但长期用药导致的肿瘤耐药以及肝肾毒性对预后有较大影响。TTM可增强顺铂诱导的ROS积累、GSH消耗和pt-DNA的生成,提高顺铂对非小细胞肺癌的疗效^[103]。TTM还可抑制ATP7A表达,减轻ATP7A对顺铂的隔离,增强DNA损伤并逆转乳腺癌的耐药性^[104]。TTM也具有抗炎与抗氧化活性,可选择性激活肝脏与肾脏的Nrf2通路,缓解顺铂诱导的急性肾损伤^[105]。TTM对Nrf2的激活是自噬依赖性的^[106],然而,其对正常细胞的保护作用是否与铜相关尚不明确。

临床研究显示,TTM具有良好的安全性与耐受性,可影响肿瘤免疫微环境中的铜相关组分,降低LOX活性进而阻碍胶原交联,抑制乳腺癌转移^[107]。TTM也具有线粒体毒性,铜的耗竭可导致CCO失活进而破坏乳腺癌细胞氧化磷酸化过程^[108]。ATOX1是乳腺癌转移的重要介质,且ATOX1表达

水平与 TTM 疗效存在显著相关性, 提示 ATOX1 可能是 TTM 用药的生物标志物^[109]。

4 总结与展望

铜是细胞生长所必需的辅因子, 铜过载与铜缺乏均不利于正常生理活动进行。铜在肿瘤的稳态调节及肿瘤进展中也发挥了重要作用。铜死亡是一种全新的铜依赖的细胞死亡形式, 以线粒体硫辛酰化蛋白聚集和铁硫簇蛋白破坏为特征。铜死亡的发现为肿瘤治疗提供了全新思路。正如表 2 所示, 铜离子载体与铜离子螯合剂是目前研究最为广泛的两类铜相关抗肿瘤药物, 可通过多种途径诱导肿瘤细胞死亡, 具有良好的应用前景。

铜死亡的具体机制仍待进一步研究。在铜死亡过程中, 细胞或分子水平的特征变化及铜死亡标志物仍待发现; 硫辛酰化蛋白聚集导致细胞死亡的具体机制尚未阐明; 既往研究已证实铜离子载体可通过多种机制诱导细胞死亡, 这些机制与铜死亡之间的联系仍待深究。铜死亡与放射治疗诱导细胞损伤的相关性还有待研究。某些铜相关抗肿瘤药物由于其血浆半衰期短, 易被清除, 因此进入肿瘤内的药物难以达到有效剂量, 如何提高此类药物的靶向性也是当下研究的热点。虽然目前已开发出多种药物靶向释放系统, 但其仍有诸多局限性, 长期组织毒

性和药代动力学有待进一步探索; 此外, 这些治疗策略仅在有限的几种肿瘤模型中得到验证, 对其他肿瘤细胞系的作用仍待进一步深入研究。

综上所述, 铜死亡是一种全新的细胞死亡形式, 为未来的抗癌药物开发、辐射防护等提供了新的研究方向, 在未来肿瘤治疗中具有不俗的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, et al. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status?. *Br J Nutr*, 2002, 87: 393-403
- [2] Chen L, Min J, Wang F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 378
- [3] Maung MT, Carlson A, Olea-Flores M, et al. The molecular and cellular basis of copper dysregulation and its relationship with human pathologies. *FASEB J*, 2021, 35: e21810
- [4] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science*, 2022, 375: 1254-61
- [5] Bost M, Houdart S, Oberli M, et al. Dietary copper and human health: current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016, 35: 107-15
- [6] Gao J, Wu X, Huang S, et al. Novel insights into anticancer mechanisms of elesclomol: more than a prooxidant drug. *Redox Biol*, 2023, 67: 102891
- [7] Morrell A, Tallino S, Yu L, et al. The role of insufficient copper in lipid synthesis and fatty-liver disease. *IUBMB*

表2 铜相关抗肿瘤药物

类型	药物	作用机制	肿瘤类型	
铜离子载体	双硫仑	抑制蛋白酶体活性	乳腺癌 ^[54,56] 、肺癌 ^[55,61]	
		抑制TIC与CSC	乳腺癌 ^[56-59]	
		ROS积累	鼻咽癌 ^[62] 、白血病 ^[63]	
		细胞周期阻滞	白血病 ^[64]	
		抑制DNA修复	胶质母细胞瘤 ^[65]	
		铁死亡	鼻咽癌 ^[62]	
		铜死亡	卵巢癌 ^[67] 、神经内分泌肿瘤 ^[68] 、肺癌 ^[70] 、乳腺癌 ^[69,71]	
		伊利司莫	ROS积累	白血病 ^[76] 、黑色素瘤 ^[78] 、胶质母细胞瘤 ^[79]
			细胞周期阻滞	白血病 ^[77]
			抑制TIC与CSC	胶质母细胞瘤 ^[79] 、卵巢癌 ^[80]
铜离子螯合剂	青霉胺	铁死亡	结直肠癌 ^[82] 、肝癌 ^[86]	
		铜死亡	肝癌 ^[83,86] 、胃癌 ^[84] 、结直肠癌 ^[85] 、乳腺癌 ^[89] 、膀胱癌 ^[90] 、结直肠癌 ^[91]	
	曲恩汀	抗血管生成	胶质母细胞瘤 ^[92] 、间皮瘤 ^[95]	
		抗血管生成	肝癌 ^[93-94] 、间皮瘤 ^[95]	
	四硫钼酸盐	抑制MAPK通路异常激活	黑色素瘤 ^[97-98] 、结直肠癌 ^[99]	
		抗血管生成	胰腺癌 ^[100] 、乳腺癌 ^[101] 、卵巢癌 ^[102]	
		化疗增敏	肺癌 ^[103] 、乳腺癌 ^[104]	
		影响肿瘤免疫微环境	乳腺癌 ^[107]	
			线粒体毒性	乳腺癌 ^[108]

- Life, 2017, 69: 263-70
- [8] de Romaña DL, Olivares M, Uauy R, et al. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J Trace Elem Med Biol*, 2011, 25: 3-13
- [9] McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 2001, 291: 1755-9
- [10] Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, et al. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 2006, 108: 1388-94
- [11] Nose Y, Kim BE, Thiele DJ. Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab*, 2006, 4: 235-44
- [12] Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW, et al. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J Nutr*, 2006, 136: 21-6
- [13] Öhrvik H, Nose Y, Wood LK, et al. Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ectodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: E4279-88
- [14] Lin C, Zhang Z, Wang T, et al. Copper uptake by DMT1: a compensatory mechanism for CTR1 deficiency in human umbilical vein endothelial cells. *Metallomics*, 2015, 7: 1285-9
- [15] Kaler SG. ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7: 15-29
- [16] Kirsipuu T, Zadorožnaja A, Smirnova J, et al. Copper(II)-binding equilibria in human blood. *Sci Rep*, 2020, 10: 5686
- [17] Lutsenko S. Dynamic and cell-specific transport networks for intracellular copper ions. *J Cell Sci*, 2021, 134: jcs240523
- [18] Gromadzka G, Tarnacka B, Flaga A, et al. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases-therapeutic implications. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 9259
- [19] Vašák M, Meloni G. Mammalian metallothionein-3: new functional and structural insights. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1117
- [20] Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, 6: 171-80
- [21] Hamza I, Faisst A, Prohaska J, et al. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 6848-52
- [22] Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, et al. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev*, 2007, 87: 1011-46
- [23] Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, et al. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J Biol Chem*, 2008, 283: 9157-67
- [24] Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD. Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 1215-20
- [25] Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 1161-208
- [26] Skopp A, Boyd SD, Ullrich MS, et al. Copper-zinc superoxide dismutase (Sod1) activation terminates interaction between its copper chaperone (Ccs) and the cytosolic metal-binding domain of the copper importer Ctr1. *Biometals*, 2019, 32: 695-705
- [27] Nývltová E, Dietz JV, Seravalli J, et al. Coordination of metal center biogenesis in human cytochrome c oxidase. *Nat Commun*, 2022, 13: 3615
- [28] Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88: 826S-9S
- [29] Horng YC, Cobine PA, Maxfield AB, et al. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem*, 2004, 279: 35334-40
- [30] Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, et al. Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 6803-8
- [31] Leary SC, Kaufman BA, Pellicchia G, et al. Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet*, 2004, 13: 1839-48
- [32] Takahashi Y, Kako K, Kashiwabara SI, et al. Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome C oxidase and embryonic development. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 7614-21
- [33] Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 2011, 40: 243-66
- [34] Pierson H, Muchenditsi A, Kim BE, et al. The function of ATPase copper transporter ATP7B in intestine. *Gastroenterology*, 2018, 154: 168-80.e5
- [35] Polishchuk EV, Concilli M, Iacobacci S, et al. Wilson disease protein ATP7B utilizes lysosomal exocytosis to maintain copper homeostasis. *Dev Cell*, 2014, 29: 686-700
- [36] Linder MC. Copper homeostasis in mammals, with emphasis on secretion and excretion. a review. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4932
- [37] Li Y. Copper homeostasis: emerging target for cancer treatment. *IUBMB Life*, 2020, 72: 1900-8
- [38] Sheline CT, Choi DW. Cu²⁺ toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases *in vitro* and *in vivo*. *Ann Neurol*, 2004, 55: 645-53
- [39] Landgraf BJ, McCarthy EL, Booker SJ. Radical S-adenosylmethionine enzymes in human health and disease. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 485-514
- [40] Lin CH, Chin Y, Zhou M, et al. Protein lipoylation: mitochondria, cuproptosis, and beyond. *Trends Biochem Sci*, 2024, 49: 729-44
- [41] Rowland EA, Snowden CK, Cristea IM. Protein lipoylation: an evolutionarily conserved metabolic regulator of health and disease. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 42: 76-85
- [42] Dreishpoon MB, Bick NR, Petrova B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS. *J Biol Chem*, 2023, 299: 105046
- [43] Tsvetkov P, Detappe A, Cai K, et al. Mitochondrial

- metabolism promotes adaptation to proteotoxic stress. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 681-9
- [44] Brancaccio D, Gallo A, Piccioli M, et al. [4Fe-4S] Cluster assembly in mitochondria and its impairment by copper. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 719-30
- [45] Vallières C, Holland SL, Avery SV. Mitochondrial ferredoxin determines vulnerability of cells to copper excess. *Cell Chem Biol*, 2017, 24: 1228-37.e3
- [46] Alhebshi A, Sideri TC, Holland SL, et al. The essential iron-sulfur protein Rli1 is an important target accounting for inhibition of cell growth by reactive oxygen species. *Mol Biol Cell*, 2012, 23: 3582-90
- [47] Garcia-Santamarina S, Uzarska MA, Festa RA, et al. *Cryptococcus neoformans* iron-sulfur protein biogenesis machinery is a novel layer of protection against Cu stress. *mBio*, 2017, 8: e01742-17
- [48] Ge EJ, Bush AI, Casini A, et al. Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22: 102-13
- [49] Wang W, Wang X, Luo J, et al. Serum copper level and the copper-to-zinc ratio could be useful in the prediction of lung cancer and its prognosis: a case-control study in Northeast China. *Nutr Cancer*, 2021, 73: 1908-15
- [50] 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. *Carcinogenesis*, 2017, 38: 699-707
- [51] Wu Z, Lv G, Xing F, et al. Copper in hepatocellular carcinoma: a double-edged sword with therapeutic potentials. *Cancer Lett*, 2023, 571: 216348
- [52] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1992, 369: 15-26
- [53] Lewis DJ, Deshmukh P, Tedstone AA, et al. On the interaction of copper(II) with disulfiram. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50: 13334-7
- [54] Skrott Z, Mistrik M, Andersen KK, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature*, 2017, 552: 194-9
- [55] Pan M, Zheng Q, Yu Y, et al. Seesaw conformations of Npl4 in the human p97 complex and the inhibitory mechanism of a disulfiram derivative. *Nat Commun*, 2021, 12: 121
- [56] Wang Y, Li W, Patel SS, et al. Blocking the formation of radiation-induced breast cancer stem cells. *Oncotarget*, 2014, 5: 3743-55
- [57] Sun T, Yang W, Toprani SM, et al. Induction of immunogenic cell death in radiation-resistant breast cancer stem cells by repurposing anti-alcoholism drug disulfiram. *Cell Commun Signal*, 2020, 18: 36
- [58] Liu P, Kumar IS, Brown S, et al. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer*, 2013, 109: 1876-85
- [59] Wu L, Meng F, Dong L, et al. Disulfiram and BKM120 in combination with chemotherapy impede tumor progression and delay tumor recurrence in tumor initiating cell-rich TNBC. *Sci Rep*, 2019, 9: 236
- [60] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*, 2013, 27: 13-24
- [61] Skrott Z, Majera D, Gursky J, et al. Disulfiram's anti-cancer activity reflects targeting NPL4, not inhibition of aldehyde dehydrogenase. *Oncogene*, 2019, 38: 6711-22
- [62] Li Y, Chen F, Chen J, et al. Disulfiram/copper induces antitumor activity against both nasopharyngeal cancer cells and cancer-associated fibroblasts through ROS/MAPK and ferroptosis pathways. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 138
- [63] Xu B, Wang S, Li R, 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. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2797
- [64] Hassani S, Ghaffari P, Chahardouli B, et al. Disulfiram/copper causes ROS levels alteration, cell cycle inhibition, and apoptosis in acute myeloid leukaemia cell lines with modulation in the expression of related genes. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 561-9
- [65] Lun X, Wells JC, Grinshtein N, et al. Disulfiram when combined with copper enhances the therapeutic effects of temozolomide for the treatment of glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 3860-75
- [66] Huang J, Campian JL, Gujar AD, et al. A phase I study to repurpose disulfiram in combination with temozolomide to treat newly diagnosed glioblastoma after chemoradiotherapy. *J Neurooncol*, 2016, 128: 259-66
- [67] Gan Y, Liu T, Feng W, et al. Drug repositioning of disulfiram induces endometrioid epithelial ovarian cancer cell death via the both apoptosis and cuproptosis pathways. *Oncol Res*, 2023, 31: 333-43
- [68] Huang N, Feng Y, Liu Y, et al. Disulfiram mediated anti-tumour effect in pituitary neuroendocrine tumours by inducing cuproptosis. *Int Immunopharmacol*, 2024, 134: 112159
- [69] Zhou J, Yu Q, Song J, et al. Photothermally triggered copper payload release for cuproptosis-promoted cancer synergistic therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2023, 62: e202213922
- [70] Li P, Sun Q, Bai S, et al. Combination of the cuproptosis inducer disulfiram and anti-PD-L1 abolishes NSCLC resistance by ATP7B to regulate the HIF-1 signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2024, 53: 19
- [71] Liu T, Zhou Z, Zhang M, et al. Cuproptosis-immunotherapy using PD-1 overexpressing T cell membrane-coated nanosheets efficiently treats tumor. *J Control Release*, 2023, 362: 502-12
- [72] Vo NH, Xia Z, Hanko J, et al. Synthesis, crystallographic characterization and electrochemical property of a copper(II) complex of the anticancer agent elesclomol. *J Inorg Biochem*, 2014, 130: 69-73
- [73] Nagai M, Vo NH, Shin Ogawa L, et al. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52: 2142-50

- [74] Gehrmann M. Drug evaluation: STA-4783--enhancing taxane efficacy by induction of Hsp70. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006, 7: 574-80
- [75] Berkenblit A, Eder JP, Ryan DP, et al. Phase I clinical trial of STA-4783 in combination with paclitaxel in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 584-90
- [76] Yadav AA, Patel D, Wu X, et al. Molecular mechanisms of the biological activity of the anticancer drug elesclomol and its complexes with Cu(II), Ni(II) and Pt(II). *J Inorg Biochem*, 2013, 126: 1-6
- [77] Hasinoff BB, Wu X, Yadav AA, et al. Cellular mechanisms of the cytotoxicity of the anticancer drug elesclomol and its complex with Cu(II). *Biochem Pharmacol*, 2015, 93: 266-76
- [78] Li Y, Yang J, Zhang Q, et al. Copper ionophore elesclomol selectively targets GNAQ11-mutant uveal melanoma. *Oncogene*, 2022, 41: 3539-53
- [79] Buccarelli M, D'Alessandris QG, Matarrese P, et al. Elesclomol-induced increase of mitochondrial reactive oxygen species impairs glioblastoma stem-like cell survival and tumor growth. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40: 228
- [80] Harrington BS, Ozaki MK, Caminear MW, et al. Drugs targeting tumor-initiating cells prolong survival in a post-surgery, post-chemotherapy ovarian cancer relapse model. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 1645
- [81] Modica-Napolitano JS, Bharath LP, Hanlon AJ, et al. The anticancer agent elesclomol has direct effects on mitochondrial bioenergetic function in isolated mammalian mitochondria. *Biomolecules*, 2019, 9: 298
- [82] Gao W, Huang Z, Duan J, et al. Elesclomol induces copper-dependent ferroptosis in colorectal cancer cells via degradation of ATP7A. *Mol Oncol*, 2021, 15: 3527-44
- [83] Li Z, Zhou H, Zhai X, et al. MELK promotes HCC carcinogenesis through modulating cuproptosis-related gene DLAT-mediated mitochondrial function. *Cell Death Dis*, 2023, 14: 733
- [84] Sun L, Zhang Y, Yang B, et al. Lactylation of METTL16 promotes cuproptosis via m6A-modification on FDX1 mRNA in gastric cancer. *Nat Commun*, 2023, 14: 6523
- [85] Yang W, Wang Y, Huang Y, et al. 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to promote cuproptosis in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159: 114301
- [86] Wang W, Lu K, Jiang X, et al. Ferroptosis inducers enhanced cuproptosis induced by copper ionophores in primary liver cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42: 142
- [87] O'Day SJ, Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, et al. Final results of phase III SYMMETRY study: randomized, double-blind trial of elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone as treatment for chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 1211-8
- [88] Huo S, Wang Q, Shi W, et al. ATF3/SPI1/SLC31A1 signaling promotes cuproptosis induced by advanced glycosylation end products in diabetic myocardial injury. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 1667
- [89] Wu H, Zhang Z, Cao Y, et al. A self-amplifying ROS-responsive nanoplatfor for simultaneous cuproptosis and cancer immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11: e2401047
- [90] Guo B, Yang F, Zhang L, et al. Cuproptosis induced by ROS responsive nanoparticles with elesclomol and copper combined with α PD-L1 for enhanced cancer immunotherapy. *Adv Mater*, 2023, 35: e2212267
- [91] Shen W, Pei P, Zhang C, et al. A polymeric hydrogel to eliminate programmed death-ligand 1 for enhanced tumor radio-immunotherapy. *ACS Nano*, 2023, 17: 23998-4011
- [92] Mammoto T, Jiang A, Jiang E, et al. Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *Am J Pathol*, 2013, 183: 1293-305
- [93] Moriguchi M, Nakajima T, Kimura H, et al. The copper chelator trientine has an antiangiogenic effect against hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of interleukin-8 production. *Int J Cancer*, 2002, 102: 445-52
- [94] Yoshii J, Yoshiji H, Kuriyama S, et al. The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*, 2001, 94: 768-73
- [95] Crowe A, Jackaman C, Beddoes KM, et al. Rapid copper acquisition by developing murine mesothelioma: decreasing bioavailable copper slows tumor growth, normalizes vessels and promotes T cell infiltration. *PLoS One*, 2013, 8: e73684
- [96] Denoyer D, Clatworthy SAS, Cater MA. Copper complexes in cancer therapy. *Met Ions Life Sci*, 2018, 18: 469-506
- [97] Brady DC, Crowe MS, Greenberg DN, et al. Copper chelation inhibits BRAFV600E-driven melanomagenesis and counters resistance to BRAFV600E and MEK1/2 inhibitors. *Cancer Res*, 2017, 77: 6240-52
- [98] Kim YJ, Tsang T, Anderson GR, et al. Inhibition of BCL2 family members increases the efficacy of copper chelation in BRAFV600E-driven melanoma. *Cancer Res*, 2020, 80: 1387-400
- [99] Baldari S, Di Rocco G, Heffern MC, et al. Effects of copper chelation on brafv600e positive colon carcinoma cells. *Cancers (Basel)*, 2019, 11: 659
- [100] Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, et al. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 19507-12
- [101] Pan Q, Bao LW, Merajver SD. Tetrathiomolybdate inhibits angiogenesis and metastasis through suppression of the NF κ B signaling cascade. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 701-6
- [102] Kim KK, Abelman S, Yano N, et al. Tetrathiomolybdate inhibits mitochondrial complex IV and mediates degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 14296
- [103] Li Y, Fang M, Xu Z, et al. Tetrathiomolybdate as an old drug in a new use: as a chemotherapeutic sensitizer for non-small cell lung cancer. *J Inorg Biochem*, 2022, 233:

- 111865
- [104] Chisholm CL, Wang H, Wong AH, et al. Ammonium tetrathiomolybdate treatment targets the copper transporter ATP7A and enhances sensitivity of breast cancer to cisplatin. *Oncotarget*, 2016, 7: 84439-52
- [105] Qi H, Shi H, Yan M, et al. Ammonium tetrathiomolybdate relieves oxidative stress in cisplatin-induced acute kidney injury via NRF2 signaling pathway. *Cell Death Discov*, 2023, 9: 259
- [106] Zhang M, Qiu H, Mao L, et al. Ammonium tetrathiomolybdate triggers autophagy-dependent NRF2 activation in vascular endothelial cells. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 733
- [107] Chan N, Willis A, Kornhauser N, et al. Influencing the tumor microenvironment: a phase II study of copper depletion using tetrathiomolybdate in patients with breast cancer at high risk for recurrence and in preclinical models of lung metastases. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 666-76
- [108] Ramchandani D, Berisa M, Tavares DA, et al. Copper depletion modulates mitochondrial oxidative phosphorylation to impair triple negative breast cancer metastasis. *Nat Commun*, 2021, 12: 7311
- [109] Blockhuys S, Hildesjö C, Olsson H, et al. Evaluation of ATOX1 as a potential predictive biomarker for tetrathiomolybdate treatment of breast cancer patients with high risk of recurrence. *Biomedicines*, 2021, 9: 1887