

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2025-01-005

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

## 二甲双胍诱导结直肠癌细胞发生铜死亡及其机制

梁慧慧<sup>1,2</sup>, 唐科<sup>1,2</sup>, 谭亲友<sup>1,2,3</sup>

1. 桂林医学院药学院, 桂林 541199; 2. 桂林医学院附属医院临床药学与临床药理学教研室, 桂林 541001;  
3. 中美健康与疾病脂质研究中心, 桂林 541001

**摘要** 目的 探讨二甲双胍诱导结直肠癌(CRC)细胞铜死亡作用及其机制。方法 体外培养 CRC 细胞系(SW480、HT29), 通过 CCK8 检测 CRC 细胞经不同浓度的 Met 分别干预 24、48、72 h 后的细胞活力; 平板克隆实验检测 Met 对 CRC 细胞的增殖能力; Transwell 检测 Met 对 CRC 细胞的迁移能力; 倒置显微镜下分别观察低、中、高剂量的 Met 对 CRC 细胞形态的影响; Met 联合铜死亡抑制剂对 CRC 细胞增殖的影响; qRT-PCR 以及蛋白免疫印迹分别从基因水平及蛋白水平上检测 Met 对 CRC 细胞中铁氧还蛋白 1(FDX1)、二氢脂酰胺 S-乙酰转移酶(DLAT)和热休克蛋白 70(HSP70)表达影响。结果 随着 Met 浓度的增加, CRC 细胞活力呈浓度以及时间依赖性下降, 而加入铜死亡抑制剂能部分逆转 Met 对 CRC 细胞活力的抑制作用; Met 显著抑制 CRC 细胞的增殖能力和迁移能力且抑制作用呈浓度依赖性, 以上结果均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。高倍镜下观察到 CRC 细胞形态发生明显改变; Met 在基因和蛋白水平均可显著抑制 FDX1 与 DLAT 的表达, 促进 HSP70 的表达( $P < 0.05$ )。结论 Met 可以通过调控 FDX1/DLAT 通路诱导 CRC 细胞铜死亡, 进而发挥抗 CRC 的作用。

**关键词:** 二甲双胍; 结直肠癌; 铜死亡; FDX1; DLAT

中图分类号: R255.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2025)01-0028-09

## Copper death in colorectal cancer cells induced by metformin and its mechanism

LIANG Huihui<sup>1,2</sup>, TANG Ke<sup>1,2</sup>, TAN Qinyou<sup>1,2,3</sup>

1. College of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. Department of Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China; 3. China US Health and Disease Lipid Research Center, Guilin 541001, China

**Abstract Objective** To investigate the effect of metformin (Met) on the copper death and explore the mechanism in colorectal cancer (CRC) cells. **Methods** CRC cell lines (SW480, HT29) were cultured in

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(82160765); 广西自然科学基金面上项目(2018GXNSFAA050147); 广西博士研究生创新项目(YCSW2023415)。

第一作者: 梁慧慧, 硕士研究生, 研究方向为药理学。

通信作者: 谭亲友, tqy1013@126.com

vitro, and CCK8 was used to detect the cell viability of CRC cells after treatment with Met for 24, 48, 72 h. The proliferation ability of CRC cells was detected by plate cloning. The migration ability of CRC cells was detected by Transwell. The effect of low, medium and high dose of Met on the morphology of CRC cells was observed under inverted microscope. The effect of copper death inhibitor on the proliferation of CRC cells induced by Met was observed. qRT-PCR and Western blot were used to detect the gene and protein expressions of ferrodoxin 1 (FDX1), dihydrolipoamide S-acetyltransferase (DLAT) and heat shock protein 70 (HSP70) in CRC cells, respectively. **Results** With the increase of Met concentration, the viability of CRC cell was significantly decreased in a concentration-dependent and time-dependent manner. The inhibitory effect of Met on CRC cell viability was partially reversed by adding Cu-death inhibitor. The proliferation and migration ability of CRC cells was significantly inhibited by Met in a concentration-dependent manner, and the results were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The morphological changes of CRC cells were observed under high power microscope. The expressionS of FDX1 and DLAT were significantly down-regulated by Met and promote the expression of HSP70 at both gene and protein levels was significantly up-regulated by Met ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Met induces the copper death in CRC cells by regulating FDX1/DLAT pathway and plays an anti-CRC role.

**Keywords:** metformin; colorectal cancer; copper death; FDX1; DLAT

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大常见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。目前,手术切除并给予药物化疗是治疗 CRC 的典型治疗方法。药物化疗存在耐受性和不良反应,影响临床应用效果<sup>[2]</sup>。二甲双胍(metformin, Met)具有毒性小的特点,常被作为一线口服降血糖药物<sup>[3]</sup>,而且其还具有抗肿瘤、免疫调节、抗衰老和抗炎作用<sup>[4]</sup>。此外, Met 在治疗乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、口腔癌和胃癌<sup>[5-9]</sup>等多种恶性肿瘤中均有效果。有研究<sup>[10]</sup>表明, CRC 晚期患者采用 Met 治疗后,生存期得到了延长,而且通过两样本孟德尔随机化分析证实, Met 能显著降低结直肠癌患者的发病率<sup>[11]</sup>。

铜死亡是一种独特的细胞死亡方式,主要依赖于细胞内铜离子的积累,通过铜与 TCA 循环的脂酰化成分直接结合,导致脂酰化蛋白质聚集和功能缺失,进而引发蛋白质毒性应激导致细胞死亡<sup>[12]</sup>。有研究<sup>[13-14]</sup>表明, Met 不仅能抑制脂肪酸合成和肿瘤生长,还能促进铜转运蛋白 1 膜转运,将机体内大部分铜摄取到细胞中。还有研究<sup>[15]</sup>表明,铜离子可增强 Met 对 3 种癌细胞系的抑制作用,并证实 Met 能

增加线粒体铜离子水平促进线粒体功能障碍,迫使细胞发生应激反应和凋亡。由此说明, Met 抗肿瘤的机制与蛋白质脂酰化介导的铜死亡十分相似, Met 是否能诱导 CRC 细胞发生铜死亡尚未清楚。基于此,本研究主要探讨 Met 抗 CRC 与铜死亡的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 Met (购自美国 Sigma-Aldrich 公司,批号: D150959); 胎牛血清(购自依科赛生物科技有限公司); DMEM 培养基(购自武汉普诺赛生命科技有限公司); 青链霉素(购自北京 Solarbio 公司); CCK8 试剂盒(购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司); 抗 FDX1 抗体与抗 DLAT 抗体(均购自英国 Abcam 公司); 抗 HSP70 抗体(购自武汉 Proteintech 公司)。

二氧化碳细胞培养箱(购自美国 Thermo Fisher 公司); 倒置光学显微镜(购自日本 Gel-View 公司); 酶标仪(购自美国 Thermo Fisher 公司); Western Blot 凝胶电泳仪、Western Blot 转膜仪(均购自美国 Bio-

Rad 公司);低温超高速离心机(购自德国 Eppendorf 公司);实时荧光定量 PCR 仪(购自美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.2 细胞系 人结直肠癌细胞 HT29(购自中国科学院上海细胞库),SW480 细胞系(购自武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.1.3 细胞培养 CRC 细胞系(SW480、HT29)培养于含有 10% 胎牛血清、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青链霉素的 DMEM 培养基中,并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中孵育。每 2~3 d 更换一次培养基。

## 1.2 方法

1.2.1 CCK8 实验 培养瓶细胞长至 80% 左右且状态良好时,用胰酶消化,将 SW480 细胞密度调整为  $8 \times 10^4$  个/mL 及 HT29 细胞密度调整为  $3.5 \times 10^4$  个/mL,之后分别接种于 96 孔板上,细胞贴壁后用不同浓度的 Met 或铜死亡抑制剂培养 24 h 后,去除培养基,重新配置含 10% 的 CCK8 的培养基加入,在培养箱孵育 1 h,使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。细胞活力 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (未加药组 OD 值 - 空白组 OD 值)  $\times 100\%$ 。

1.2.2 平板克隆实验 将 SW480 细胞按照不同分组,即对照组, Met 低、中、高浓度组(浓度分别为 10、20、40 mmol/L)进行给药处理;HT29 细胞则按照对照组, Met 低、中、高浓度组(浓度分别为 15、30、60 mmol/L)进行分组。两组给药干预 24 h 后,均用胰酶消化细胞,将细胞重悬后计数,将配好的细胞悬液分别接种于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 吹打混匀后,放于细胞孵育箱培养约 14 d。之后,将六孔板取

出后吸掉上清,采用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min,弃去固定液,加入 0.1% 结晶紫染色液染色后,采用 PBS 清洗,于室温下晾干,最后拍照进行数据处理,并计算平板克隆形成率。

1.2.3 Transwell 实验 选用 8  $\mu\text{m}$  孔径聚碳酸酯膜的 Transwell 小室进行细胞迁移侵袭能力检测。将 SW480 细胞与 HT29 细胞分组处理 24 h 后,经胰酶消化,加入无血清的培养基进行重悬并计数。将 SW480 细胞密度调整为  $7 \times 10^4$  个/mL, HT29 细胞密度调整为  $5 \times 10^4$  个/mL,向 Transwell 小室各加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液。之后,分别加入 500  $\mu\text{L}$  完全培养基培养 24 h,经 4% 多聚甲醛固定后,采用结晶紫染色、晾干,于 200 $\times$  光学显微镜下取中央及四周共 5 个视野,计算透过小室的细胞数,并统计结果。

1.2.4 倒置光学显微镜下观察细胞形态 通过不同分组对 SW480 细胞给予 Met 干预 24 h 后,吸去药液后,采用 PBS 清洗 3 次,在细胞背景为透明的条件下,于 40 $\times$  倍镜下观察细胞数量及形态学的变化并拍照。

1.2.5 qRT-PCR 实验 将生长良好的 SW480 细胞和 HT29 细胞分别接种于 6 孔板, Met 给药干涉 24 h 后用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,采用分光光度计测定 RNA 浓度和纯度;逆转录试剂盒用于将 RNA 逆转录为 cDNA,加入目的基因引物,引物名称及序列如表 1 所示。后续进行各组样本的目标基因和内参基因的扩增。使用荧光定量 PCR 仪检测各组 mRNA 情况,结果以 Ct 值表示,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算目的基因 mRNA 的相对表达量,从基因水平检测 FDX1、DLAT 及 HSP70 因子的表达情况。

表 1 引物名称及序列

引物名称	上游引物	下游引物
GADPH	CAGGAGGCATTGCTGATGAT	GAAGGCTGGGGCTCATT
FDX1	CTGCGCGCCGCTTCT	TTCCCTCACATGCACCAAAGC
DLAT	ATCAGCAACATTCGTCCGGT	ACTGACCGCAACTGACAT
HSP70	AGCCCAAACCCAAAGTGGAA	CCTTGTCCATCCACTGGTCC

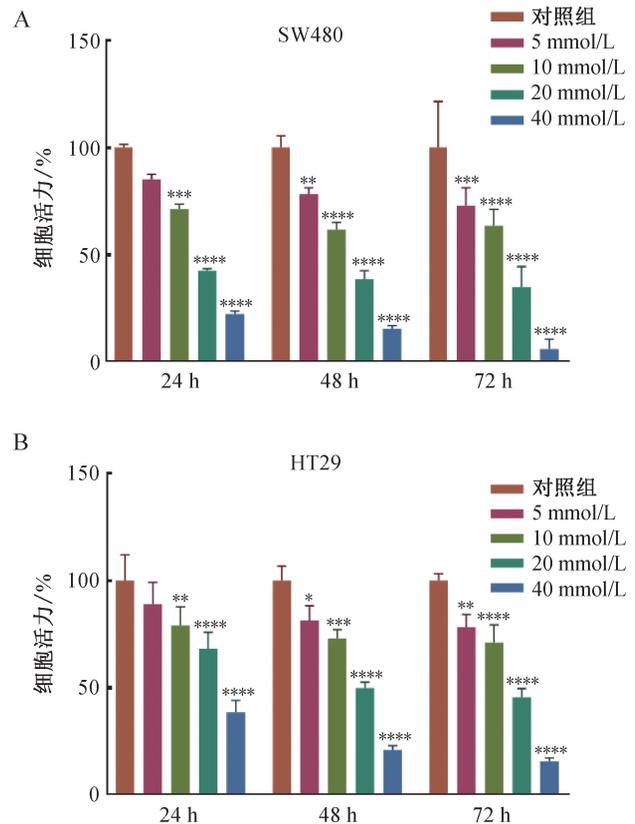
1.2.6 蛋白免疫印迹分析 收集处理过的细胞匀浆提取总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒绘制蛋白标准曲线,对蛋白进行定量,加入上样缓冲液煮沸变性。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离,电转 1.5 h 至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗,4 ℃ 孵育过夜,洗膜 3 次,加入二抗,室温孵育 1 h,洗膜 3 次,使用发光仪采集信号和图片。采用 Image J 软件分析,并从蛋白水平检测 FDX1、DLAT 及 HSP70 蛋白表达情况。

1.2.7 统计学方法 数据采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.5 统计软件进行分析,计量数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用  $t$  检验或单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Met 抑制 CRC 细胞的增殖能力

本研究采用不同浓度的 Met 处理 SW480 细胞和 HT29 细胞,使用 CCK8 法检测细胞增殖情况。实验结果如图 1 所示, Met 分别作用两株细胞 24 h,发现 Met 呈剂量依赖性抑制 SW480 细胞和 HT29 细胞的增殖,因此后续实验均选择 24 h 作为给药时间。此外,20 mmol/L 接近 Met 对 SW480 细胞的半数抑制浓度,由此后续将 10、20、40 mmol/L 作为 SW480 细胞给药的低、中、高浓度。当 Met 浓度为 30 mmol/L 时,接近 Met 对 HT29 细胞的半数抑制浓度,由此后续将 15、30、60 mmol/L 作为 HT29 细胞给药的低、中、高浓度。当 Met 作用时间分别延长至 48、72 h,其抑制作用增强。表明 Met 呈时间和剂量依赖性抑制 CRC 细胞的增殖。

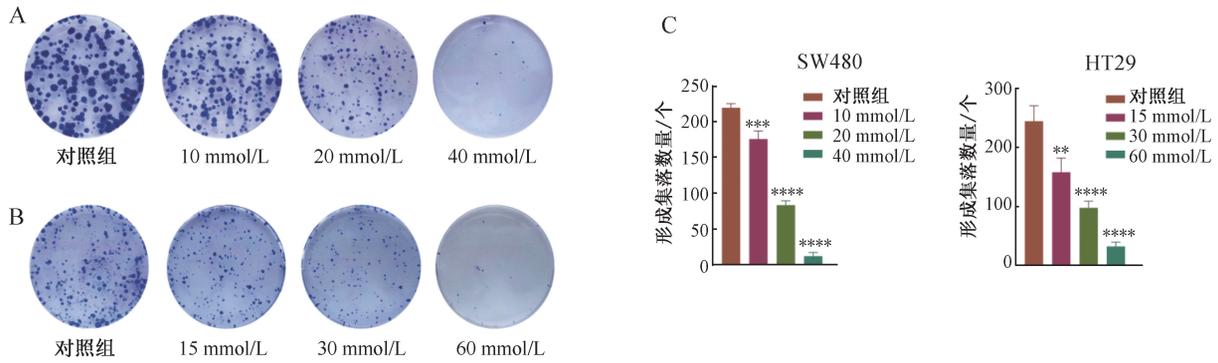


注:A.Met 抑制 SW480 细胞增殖;B.Met 抑制 HT29 细胞增殖。与对照组相比,\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 1 CCK8 法检测不同浓度与不同时间 Met 对 CRC 细胞增殖能力的影响

### 2.2 Met 抑制 CRC 细胞克隆形成能力

通过平板克隆实验,观察不同分组对 SW480 细胞与 HT29 细胞形成菌落的影响,结果如图 2 所示,与对照组相比, Met 干预后形成的细胞集落数量及集落面积均随 Met 浓度的增大而减小。此结果表明, Met 能抑制 CRC 细胞的增殖及克隆形成能力。



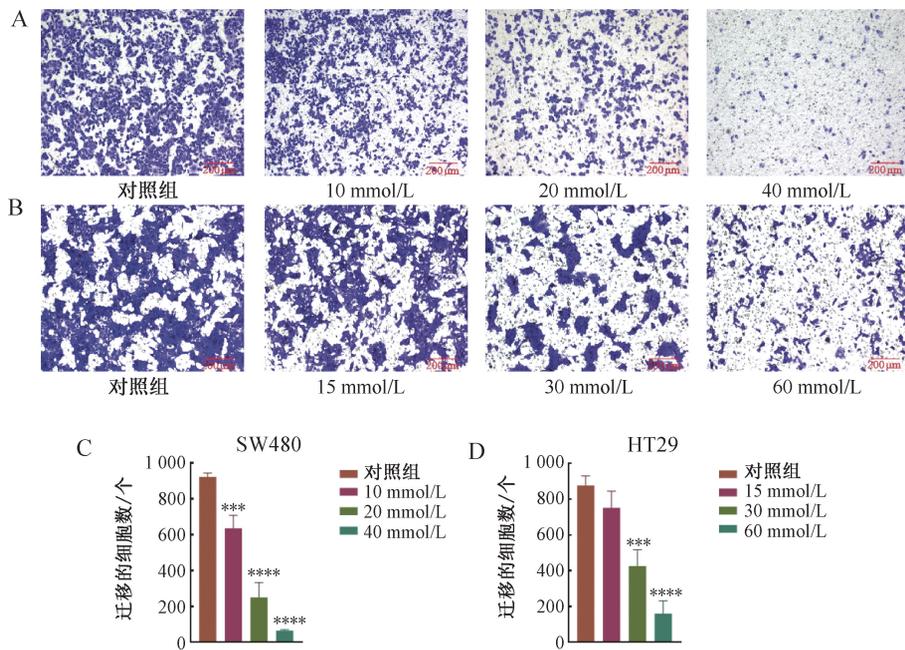
注:A.Met 抑制 SW480 细胞克隆形成能力;B.Met 抑制 HT29 细胞克隆形成能力;C.SW480 细胞克隆能力统计图;D.HT29 克隆能力统计图。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 2 平板克隆形成实验检测 Met 对 CRC 细胞克隆形成能力的影响

### 2.3 Met 抑制 CRC 细胞迁移能力

Transwell 实验检测不同浓度 Met 对 SW480 细胞与 HT29 细胞迁移能力影响,结果如图 3 所示,与对

照组相比,随着 Met 浓度的增加,CRC 细胞迁移的细胞数逐渐减少。此结果表明, Met 可以明显抑制 CRC 细胞的迁移能力。



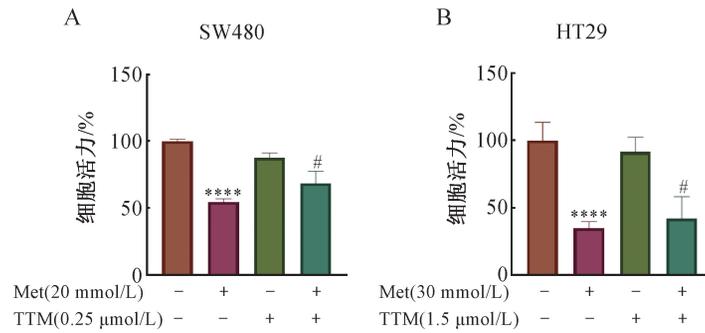
注:A.Met 抑制 SW480 细胞迁移图;B.Met 抑制 HT29 细胞迁移图;C.SW480 细胞迁移能力统计图;D.HT29 细胞迁移能力统计图。与对照组相比, \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 3 Transwell 实验检测 Met 对 CRC 细胞迁移能力的影响

### 2.4 铜死亡抑制剂能逆转 Met 对 CRC 细胞的增殖能力

探讨 Met 抑制 CRC 细胞增殖与迁移是否通过诱发铜死亡发生,本研究使用铜死亡抑制剂 TTM 与 Met 共同干预 CRC 细胞进行细胞活力测定。结果如

图 4 所示, Met 联合铜死亡抑制剂后可以逆转 Met 对 SW480 细胞与 HT29 细胞的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。此结果表明, Met 是通过铜死亡途径来抑制 CRC 细胞的增殖能力。



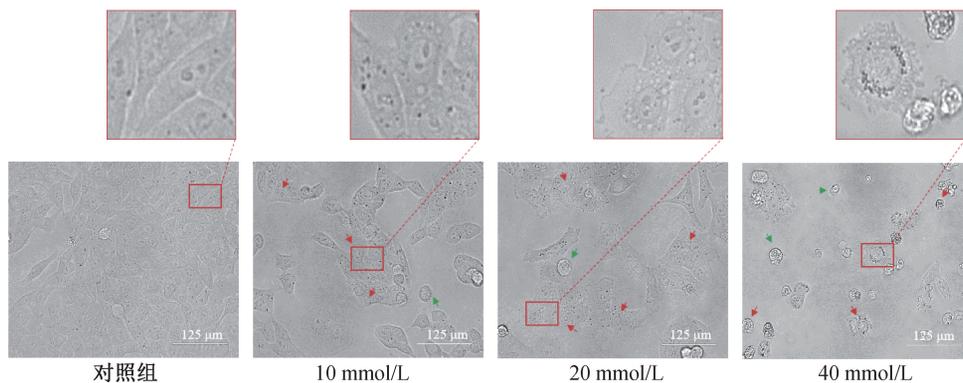
注:A.TTM 逆转 Met 对 SW480 细胞增殖能力;B.TTM 逆转 Met 对 HT29 细胞增殖能力。与对照组相比,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ;与 Met 给药组相比,# $P < 0.05$ ;"+"表示加入,"-"表示未加入。

图 4 铜死亡抑制剂 TTM 与 Met 联用对 CRC 细胞增殖能力的影响

### 2.5 Met 改变 SW480 细胞形态及生长情况

随着 Met 浓度的增加,SW480 细胞的数量减少,且形态发生变化,结果如图 5 所示。正常 SW480 细胞的细胞膜核清晰可见,呈长梭形贴壁生长;在 Met 干预后,随着给药浓度增加,细胞形态发生变化,细

胞膜破裂程度逐渐加深,细胞出现气泡化变形,并扩散至细胞质进而裂解细胞核,导致细胞核裂解完全死亡,最后呈圆形飘起。这一死亡特征与铜死亡<sup>[16]</sup>中的细胞膜破裂、细胞空泡变形相符合。



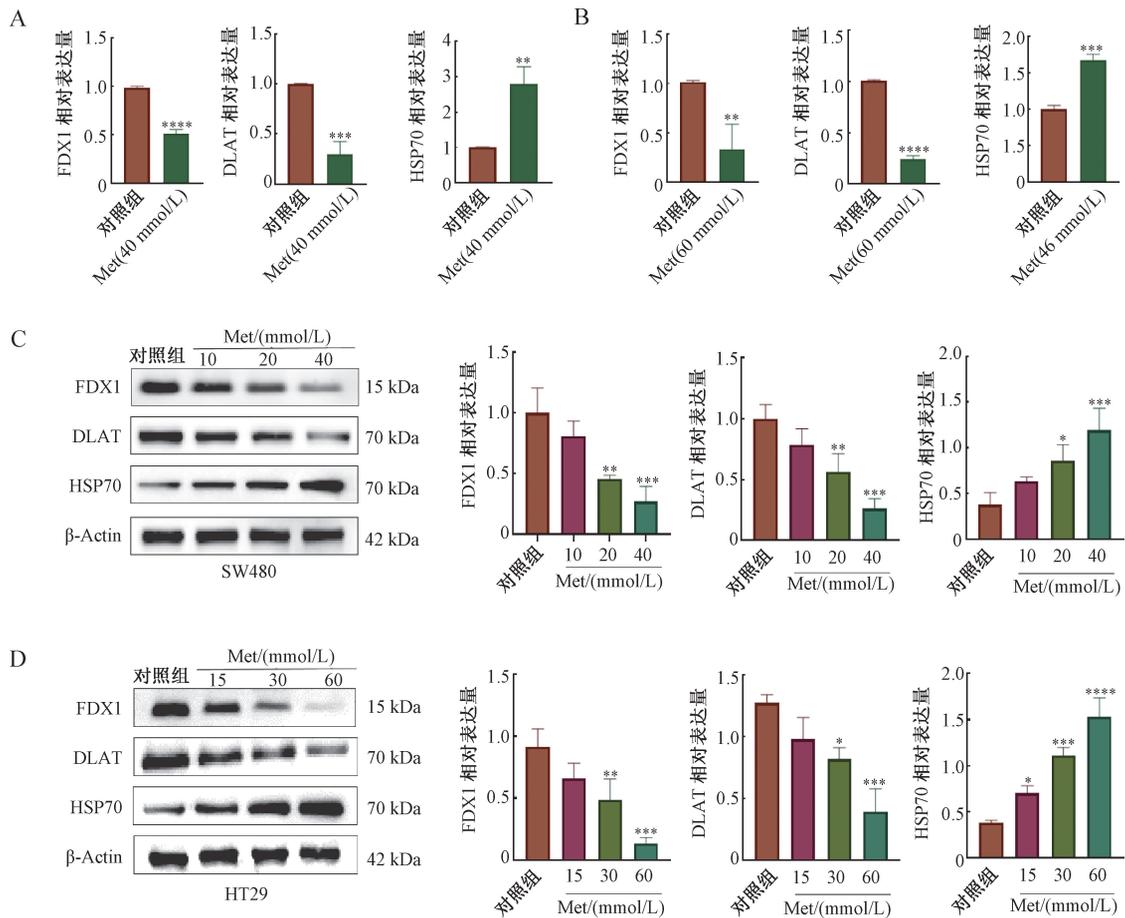
注:红色箭头指示出现气泡化,绿色箭头指示细胞变圆。

图 5 40×高倍镜下不同浓度 Met 对 SW480 细胞形态的影响

### 2.6 Met 对 CRC 细胞中铜死亡关键调控因子的影响

为证实 Met 诱导 CRC 细胞发生铜死亡,本研究通过 qRT-PCR 与蛋白免疫印迹分析检测 Met 干预后 CRC 细胞中与铜死亡密切相关的关键调控因子的表达水平,结果如图 6 所示。qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,Met 给药干预后,铜死亡关键调控

因子 FDX1、DLAT 的 mRNA 水平下调,HSP70 的 mRNA 水平则上调。蛋白免疫印迹分析与 qRT-PCR 结果相符,CRC 细胞中 FDX1、DLAT 的蛋白表达水平随 Met 干预浓度的增加而减少,HSP70 蛋白表达水平则随 Met 干预浓度的增加而升高。此结果表明,Met 能够下调 CRC 细胞中的 FDX1 与 DLAT 的表达,升高 HSP70 表达,进而诱发铜死亡。



注:A.qRT-PCR 验证 SW480 细胞中铜死亡关键因子在 mRNA 水平的表达;B.qRT-PCR 验证 HT29 细胞中铜死亡相关因子在 mRNA 水平的表达;C.SW480 细胞中铜死亡关键蛋白表达水平;D.HT29 细胞中铜死亡关键蛋白表达水平。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图 6 Met 对 CRC 细胞中铜死亡关键调控因子的影响

### 3 讨论

CRC 是由息肉样前体发展而来,多种信号通路参与调控其恶性进展。尽管有内镜和 CT 结肠造影等先进技术可以准确筛查和诊断 CRC,但由于该疾病早期症状不明显,在发展到中晚期才出现明显症状,以至于部分患者错过最佳治疗时期<sup>[17]</sup>。Met 基于安全性好和耐受性强的特点,已被用作抗肿瘤剂,这给 CRC 的治疗带来了希望。Met 的抗肿瘤作用在临床和临床前研究中存在差异<sup>[18-19]</sup>,因此其抗肿瘤机制还需进一步研究。铜死亡不同于已知的细胞死亡机制,其主要受线粒体呼吸调节并由蛋白质脂酰化介导。线粒体代谢和铜介导的细胞死亡敏感性之间存在关联,可为抗肿瘤治疗提供新的研究思路。

目前,Met 在 CRC 治疗中的机制研究较少,而且

尚未有文献报道 Met 能诱导结直肠癌细胞发生铜死亡。而有研究<sup>[12]</sup>表明,FDX1 和蛋白质脂酰化是铜死亡的关键调节因子。FDX1 是含有铁硫簇蛋白的线粒体还原酶,在许多进化保守的细胞代谢过程中充当必需的电子供体,促使 ES 结合并运载  $\text{Cu}^{2+}$  到线粒体,还原成毒性强大的  $\text{Cu}^+$ ,进而抑制 Fe-S 簇蛋白形成,增强蛋白质毒性功能诱导细胞死亡<sup>[20]</sup>。此外,有研究<sup>[21]</sup>表明,FDX1 是蛋白质脂酰化的上游调节因子,这为 FDX1 还原  $\text{Cu}^{2+}$  及蛋白质脂酰化机制诱导铜死亡提供有利参考。DLAT 是蛋白质脂酰化关键因子,可与  $\text{Cu}^{2+}$  结合诱导 DLAT 的寡聚化,减少脂酰化,进而抑制 TCA,并在 FDX1 调节下加快细胞毒性应激反应,进而导致细胞铜死亡<sup>[22]</sup>。此外,DLAT 基因高表达可能代偿铜死亡中异常的脂酰化

蛋白聚集,进而促进肿瘤细胞存活<sup>[23]</sup>。DLAT 是与结肠腺癌生存相关的糖酵解基因,其在结肠腺癌的表达水平高于健康结肠组织<sup>[24]</sup>。已有研究<sup>[25]</sup>表明, Met 与铜协调可改善药理学特性并降低耐药性。研究<sup>[26]</sup>证实,在 CRC 中抑制有氧糖酵解可以启动铜死亡实现抗肿瘤作用,而 Met 能抑制有氧糖酵解显示出抗肿瘤特性<sup>[27]</sup>。因此,我们推测 Met 在 CRC 中的抗肿瘤机制可能是 Met 通过调控 FDX1/DLAT 通路诱导 CRC 细胞发生铜死亡而实现。

基于 Met 与铜死亡的密切联系,本研究通过 CCK8 实验采用铜死亡抑制剂和 Met 联用检测 CRC 细胞活力。结果显示,铜死亡抑制剂能逆转部分 Met 对 CRC 细胞的增殖作用,表明 Met 抑制 CRC 细胞的增殖作用可能通过诱发铜死亡实现。此外,本研究通过 qRT-PCR 与蛋白免疫印迹分析对这一结果进行了验证。结果显示, Met 可以抑制铜死亡关键因子 FDX1 与 DLAT 的表达,促进热休克蛋白 HSP70 的表达,由此表明 Met 抑制 CRC 细胞的增殖、迁移可能是通过参与调控铜死亡而发生。

#### 4 结论

本研究证实, Met 可通过调控 FDX1/DLAT 通路诱导 CRC 细胞铜死亡,为后续 Met 抗 CRC 研究提供参考。

#### 参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021,71(3):209-249.
- [2] DARIYA B, ALIYA S, MERCHANT N, et al. Colorectal cancer biology, diagnosis, and therapeutic approaches[J]. *Crit Rev Oncog*, 2020,25(2):71-94.
- [3] BAILEY C J. Metformin: historical overview[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(9):1566-1576.
- [4] FORETZ M, GUIGAS B, VIOLLET B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2023,19(8):460-476.
- [5] CEJUELA M, MARTIN-CASTILLO B, MENENDEZ J A, et al. Metformin and breast cancer: where are we now? [J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(5):2705.
- [6] EIBL G, ROZENGURT E. Metformin: review of epidemiology and mechanisms of action in pancreatic cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2021,40(3):865-878.
- [7] GARCÍA-SÁENZ M, LOBATON-GINSBERG M, FERREIRA-HERMOSILLO A. Metformin in differentiated thyroid cancer: molecular pathways and its clinical implications[J]. *Biomolecules*, 2022,12(4):574.
- [8] SAHNI V, KUMAR A, GUPTA S, et al. Metformin and oral cancer[J]. *Oral Oncol*, 2022,134:106125.
- [9] LAN W H, LIN T Y, YEH J A, et al. Mechanism underlying metformin action and its potential to reduce gastric cancer risk[J]. *Int J Mol Sci*, 2022,23(22):14163.
- [10] KAMARUDIN M N A, SARKER M M R, ZHOU J R, et al. Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019,38(1):491.
- [11] 邱汉波, 唐东昕, 杨兵, 等. 二甲双胍与结直肠癌发病关系的两样本孟德尔随机化研究[J]. *现代预防医学*, 2024,51(13):2484-2490.
- [12] 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.
- [13] ZHANG X M, JIANG Q W, SU Y Q, et al. AMPK phosphorylates and stabilises copper transporter 1 to synergise metformin and copper Chelator for breast cancer therapy[J]. *Br J Cancer*, 2023,128(8):1452-1465.
- [14] ABDELRAHMAN S, ALGHRABLY M, CAMPAGNA M, et al. Metal complex formation and anticancer activity of Cu ( I ) and Cu ( II ) complexes with metformin[J]. *Molecules*, 2021,26(16):4730.
- [15] MÜLLER S, VERSINI A, SINDIKUBWABO F, et al. Correction: Metformin reveals a mitochondrial copper addiction of mesenchymal cancer cells[J]. *PLoS One*, 2018, 13(11):e0208213.
- [16] WU H B, GUO H R, LIU H, et al. Copper sulfate-induced endoplasmic reticulum stress promotes hepatic apoptosis by activating CHOP, JNK and caspase-12 signaling pathways[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020,191:110236.
- [17] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J, et al. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2019,394(10207):1467-1480.
- [18] HUA Y, ZHENG Y, YAO Y R, et al. Metformin and cancer hallmarks: shedding new lights on therapeutic re-

- purposing[J]. *J Transl Med*, 2023,21(1):403.
- [19] LAMOIA T E, SHULMAN G I. Cellular and molecular mechanisms of metformin action[J]. *Endocr Rev*, 2021, 42(1):77-96.
- [20] TSVETKOV P, DETAPPE A, CAI K, et al. Mitochondrial metabolism promotes adaptation to proteotoxic stress[J]. *Nat Chem Biol*, 2019,15(7):681-689.
- [21] DREISHPOON M B, BICK N R, PETROVA B, et al. FDX1 regulates cellular protein lipoylation through direct binding to LIAS[J]. *J Biol Chem*, 2023,299(9):105046.
- [22] 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.
- [23] 张晓晶,胡林霞,卜迁,等.细胞铜死亡:肿瘤防治研究新领域[J].*现代预防医学*,2024,51(7):1325-1330,1337.
- [24] CHEN S H, CAO G D, WU W, et al. Mining novel cell glycolysis related gene markers that can predict the survival of colon adenocarcinoma patients[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8):BSR20201427.
- [25] RUSANOV D A, ZOU J Y, BABAK M V. Biological properties of transition metal complexes with metformin and its analogues[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(4):453.
- [26] YANG W C, WANG Y X, HUANG Y Z, et al. 4-Octyl itaconate inhibits aerobic glycolysis by targeting GAPDH to promote cuproptosis in colorectal cancer[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023,159:114301.
- [27] ZHANG T, WANG Y, CHEN Y Y, et al. Metformin alleviates nickel-refining fumes-induced aerobic glycolysis via AMPK/GOLPH3 pathway in vitro and in vivo[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022,236:113461.

[收稿日期:2024-10-14]

[责任编辑:郭海婷 英文编辑:周寿红]