

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.008

铜死亡相关基因 COX17 在乳腺癌组织和细胞中的表达及其与临床特征和患者预后的关系

沙巴海提·吾斯曼¹, 伊娜^{△1}, 刘志琴¹, 卢宛瑶², 钟炫宇², 孜尔蝶·奴合杰提¹, 侯秋莲¹, 刘玲¹(1. 新疆医科大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 新疆地方病分子生物学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆医科大学临床医学院 2021-10 班, 新疆 乌鲁木齐 830017)

[摘要] **目的:** 探究铜死亡相关基因 COX17 在乳腺癌组织和细胞中的表达及其与肿瘤免疫细胞浸润、临床特征和患者预后的关系。**方法:** 通过多种数据库数据分析 COX17 在人体正常组织和泛癌组织与细胞中的表达及其与患者预后的关系、COX17 基因突变情况、COX17 表达水平与肿瘤免疫微环境的相关性、COX17 在浸润性乳腺癌中表达水平及其与患者临床病理特征的相关性、在乳腺癌细胞中 COX17 基因遗传突变及甲基化情况、COX17 差异共表达基因的功能富集分析, 构建 COX17 蛋白质相互作用网络及功能分析。采用免疫组化法检测 COX17 蛋白在国人乳腺癌组织中的表达以验证数据库分析结果。**结果:** COX17 mRNA 广泛分布于全身组织中且在多数癌组织中呈高表达, COX17 蛋白在乳腺癌等癌组织中呈高表达, COX17 mRNA 表达水平明显影响乳腺癌等癌症患者的预后, COX17 基因在多种癌组织中突变频率高且其主要突变类型为错义突变、扩增和深度缺失, COX17 mRNA 表达水平与多种肿瘤的肿瘤纯度和多种免疫细胞浸润存在相关性, COX17 蛋白水平与乳腺癌临床分期、病理分型、淋巴结转移、患者性别和年龄有关联。免疫组化检测结果证实在国人乳腺癌组织中 COX17 蛋白也呈高表达, COX17 基因在乳腺癌中遗传突变和修饰特征分别是截断突变和启动子区高度甲基化。COX17 蛋白与 ATOX1 等多种蛋白表达相关且构成复杂的相互作用网络, COX17 在乳腺癌中差异表达基因主要涉及氧化还原酶活性、蛋白翻译、氧化磷酸化及 TNF 信号通路等生物过程。**结论:** COX17 在乳腺癌组织和细胞中呈高表达, 且与癌组织的免疫细胞浸润和患者预后相关, COX17 是临床治疗乳腺癌的潜在靶点。

[关键词] COX17; 铜死亡; 乳腺癌; 预后; 临床特征; 免疫细胞浸润; 生物信息学分析

[中图分类号] R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)12-1088-11

Expression of cuproptosis-related gene COX17 in breast cancer tissues and cells and its association with clinical features and patient prognosis

SHABAHAITI·Wusiman¹, YI Na^{△1}, LIU Zhiqin¹, LU Wanyao², ZHONG Xuanyu², ZIERDIE·Nuhejieti¹, HOU Qiulian¹, LIU Ling¹ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology for Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 800017, Xinjiang, China; 2. Class 2021-10, School of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 800017, Xinjiang, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of COX17 in pan-cancerous tissues and its relationship with tumor immune cell infiltration and the prognosis of patients. **Methods:** The expressions of COX17 in human normal tissues and pan-cancerous tissues and its relationship with the prognosis of patients, the mutation of COX17 gene, the correlation between the expression level of COX17 and tumor immune microenvironment, the correlation between the expression level of COX17 in invasive breast cancer and the clinicopathological characteristics of patients, the genetic mutation and methylation of COX17 gene in breast cancer cells were analyzed, using a variety of public cancer database data. The functional enrichment analysis of the differentially co-expressed genes of COX17 in breast cancer, the construction of the protein interaction network of COX17 and the functional analysis were carried out. Finally, the expression of COX17 protein in breast cancer tissues of Chinese nationals was detected by immunohistochemistry to verify database analysis results. **Results:** COX17 mRNA is widely distributed in the whole body and highly expressed in most cancer tissues. COX17 protein is highly expressed in breast cancer and other cancer tissues. The expression level of COX17 mRNA significantly affects the prognosis of patients with breast cancer and other cancers. COX17 gene has a high mutation frequency in a variety of cancer

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(No. 2023D01C40)

[作者简介] 沙巴海提·吾斯曼(1997—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤分子机制的研究。E-mail: saba920@163.com; 伊娜(1987—), 女, 硕士生, 讲师, 主要从事肿瘤及肺结核发病机制的研究。E-mail: 124504195@qq.com。△为共同第一作者

[通信作者] 刘玲, E-mail: liulingpine@126.com

tissues, and its main mutation types are missense mutation, amplification and deep deletion. The expression level of COX17 mRNA was correlated with tumor purity and immune cell infiltration in a variety of tumors. The expression level of COX17 was correlated with the clinical stage, the pathological type, lymph node metastasis, the gender and age of patients. Immunohistochemical detection results confirmed that COX17 protein was also highly expressed in the breast cancer tissues of Chinese nationals. The genetic mutation and modification characteristics of COX17 gene in breast cancer were truncation mutation and promoter hypermethylation, respectively, COX17 protein is related to the expressions of ATOX1 and other proteins and forms a complex interaction network. The differentially expressed genes of COX17 in breast cancer mainly involve biological processes such as oxidoreductase activity, protein translation, oxidative phosphorylation and TNF signaling pathway. **Conclusion:** COX17 is highly expressed in most pan cancers and is related to the immune cell infiltration of a variety of tumors and the prognosis of patients. COX17 is a potential target for clinical treatment of breast cancer.

[Key words] COX17; cuproptosis; breast cancer; prognosis; clinical characteristic; immune cell infiltration; bioinformatics analysis

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(12): 1088-1098. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.12.008]

铜死亡(cuproptosis)是新近发现的一种新的细胞程序性死亡方式,是通过不断积累的铜与三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中脂酰化成分直接结合导致脂酰化蛋白质聚集以及铁硫簇蛋白质丢失,从而引起蛋白质毒性应激,最终导致细胞死亡^[1]。COX17是线粒体呼吸链内细胞色素c氧化酶(cytochrome c oxidase, CcO)的铜分子伴侣,定位于线粒体内膜中,是CcO组装必需的高度保守低分子量蛋白质^[2-3]。CcO是分解代谢过程中的一种关键酶,在线粒体内膜通过将电子从细胞色素c转移至氧分子而参与呼吸链^[4]。CcO铜位点的组装除COX17外,还需要COX11和重组人SCO细胞色素氧化酶缺陷同源物1(recombinant human SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1, Sco1)辅助蛋白的参与。线粒体内膜蛋白CcO和Sco1分别被认为是细胞色素氧化酶CuB和CuA位点的铜供体,而COX17是线粒体细胞内膜中Sco1的铜供体^[5]。LIU等^[6]发现,铜死亡相关基因COX17可能参与多种恶性肿瘤的发生,铜代谢相关基因可能对癌症的诊断和预后起重要作用。RAMCHANDANI等^[7]研究发现,COX17的表达下调限制了线粒体和表型铜螯合剂四硫钼酸盐(tetrathiomolybdate, TM)介导的改变。而TM与高风险三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)患者生存获益相关,这说明铜代谢转移轴可以作为高风险TNBC有潜力的治疗方法。目前对于肿瘤中COX17表达与患者预后及免疫相关性的研究还很少,对COX17在肿瘤发病中的作用,尤其是在乳腺癌中的作用还没有全面了解。本研究利用相关数据库进行了铜死亡相关蛋白COX17的泛癌分析,并结合基础实验探讨了COX17在乳腺癌中的表达及其与乳腺癌临床特征的相关性,拟为寻找肿瘤预后预测因子和治疗新靶点提供新思路。

1 资料与方法

1.1 组织标本及主要试剂

乳腺癌组织芯片(型号OD-CT-RpBre 03-004)购自上海芯超生物科技有限公司,包含了31例乳腺癌患者的组织与其相对应的31例癌旁组织。31例乳腺癌患者中,年龄在40~70岁,病理类型为乳腺浸润性导管癌,所有患者术前均未接受放化疗治疗。兔抗COX17抗体购自Proteintech公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物科技有限。

1.2 免疫组化法检测乳腺癌组织中COX17蛋白的表达

组织芯片经二甲苯脱蜡、不同梯度乙醇水化、内源性过氧化物酶灭活、抗原修复和山羊血清封闭后,滴加COX17一抗(稀释比例为1:200)4℃下处理过夜。滴加即用型辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG 37℃处理30 min,滴加DAB显色液反应30 s,苏木精复染1 min后在1%盐酸乙醇中分化,最后将组织芯片用梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片并晾干。在光学显微镜下采集图片,并用Image J软件计算积分灰度值。

1.3 通过数据库数据分析COX17在泛癌组织中的表达及其与患者预后的关系

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)(<https://portal.gdc.cancer.gov>)中收集了39种肿瘤组织中COX17 mRNA表达数据,通过TIMER 2.0数据库^[8-9](<http://timer.cistrome.org>)进一步分析了COX17在正常组织和泛癌组织中表达情况。COX17蛋白在泛癌组织中的相对表达数据来自人类蛋白质图谱(The Human Protein Atlas, HPA)^[10](<https://www.proteinatlas.org/>)。使用Kaplan-Meier-Plotter数据库^[11]分析在泛癌中COX17 mRNA表达水平与患者总生存(OS)率的关系。

1.4 用数据库数据分析在泛癌中COX17基因突变情况

利用cBioportal数据库^[12](<http://www.cbioportal.org/>)分析了TCGA泛癌数据集中COX17的基因改变。关于COX17基因的改变和突变位点的数据来自“OnCoprnt”、“Summary of Cancer Types”和“Mutations”模块。

1.5 用数据库数据分析 COX17 mRNA 表达水平与肿瘤免疫细胞浸润的相关性

通过 TIMER 2.0 数据库中转录组测序表达谱数据分析在乳腺癌、肉瘤样肺癌、肝癌、宫颈鳞状细胞癌、结直肠癌和卵巢癌等6种癌组织中 COX17 mRNA 的表达水平与 B 细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和 DC 在内的 6 种免疫细胞浸润水平的相关性。

1.6 用数据库数据分析在浸润性乳腺癌中 COX17 mRNA 表达水平与患者临床病理特征的相关性

通过 UALCAN 数据库^[13](<http://ualcan.path.uab.edu/>)分析乳腺癌中 COX17 mRNA 的表达水平。筛选条件: ① gene symbol=COX17; ② TCGA dataset=breast invasive carcinoma。满足条件的乳腺癌样本 1 097 例、正常组织样本 114 例。并利用 UALCAN 数据库进一步分析 COX17 mRNA 表达水平与浸润性乳腺癌分期、淋巴结转移、年龄和性别之间的关系。

1.7 用数据库数据分析乳腺癌患者 COX17 基因遗传突变及甲基化

用 UALCAN 数据库与 cBioportal 数据库(<http://www.cbioportal.org/>)分析 COX17 基因在乳腺癌中的甲基化与遗传突变情况。在 UALCAN 数据库中选择 Breast Cancer, 包括 890 例样本, 选择“methylation”进行分析。在 cBioportal 数据库中, 使用 Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Pan-cancer Atlas) 和 Metastatic Breast Cancer (MSK, Cancer Discovery 2022) 等 15 个数据集, 通过“Mutations”模块分析乳腺癌组织中 COX17 基因的突变情况。

1.8 用数据库数据分析在乳腺癌中 COX17 差异共表达基因的功能富集

基于 LinkedOmics 数据库^[14](<http://www.linkedomics.org/login.php>)分析了 COX17 在乳腺癌中的差异性表达基因, 筛选出差异显著 ($P<0.05$) 且关联最紧密的前 50 个基因绘制热图, 然后对这 50 个基因进行 GO 功能富集和 KEGG 分析。

1.9 COX17 的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建与相关互作蛋白分析

利用 STRING 数据库^[15](<https://string-db.org/>)探索 COX17 的潜在蛋白互作网络。利用 GEPIA 数据库^[16](<https://gepia.cancer-pku.cn/>)“Correlation”分析 10 个互作蛋白在乳腺癌中与 COX17 表达的相关性。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 23.0 分析处理数据, GraphPad 9 软件绘制统计图。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间差异比较采用配对 *t* 检验, Kaplan-Meier 法分析生存曲线, 互作蛋白之间的关系采用 Pearson 相关性分析。

以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 COX17 mRNA 和蛋白在多种类型肿瘤组织中呈高表达

GTEX 数据集显示, COX17 mRNA 和蛋白广泛表达于全身各个系统中, 在肌肉、内分泌和消化道等正常组织中呈高水平表达 (图 1A)。在不同种类肿瘤的肿瘤细胞中, COX17 mRNA 在乳腺癌细胞 MCF-7 中表达最高 (图 1B)。通过 TIMER 2.0 数据库分析了 COX17 mRNA 在泛癌中的表达情况, 结果 (图 1C) 显示, 与癌旁组织比较, 乳腺癌、膀胱移行细胞癌、宫颈鳞状细胞癌、食管癌、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌, 肺鳞状细胞癌、前列腺癌和胃腺癌组织中 COX17 mRNA 均呈明显高表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而胶质母细胞瘤中 COX17 mRNA 呈低表达 ($P<0.01$)。

2.2 HPA 数据库数据分析显示 COX17 蛋白在乳腺癌等癌组织中呈高表达

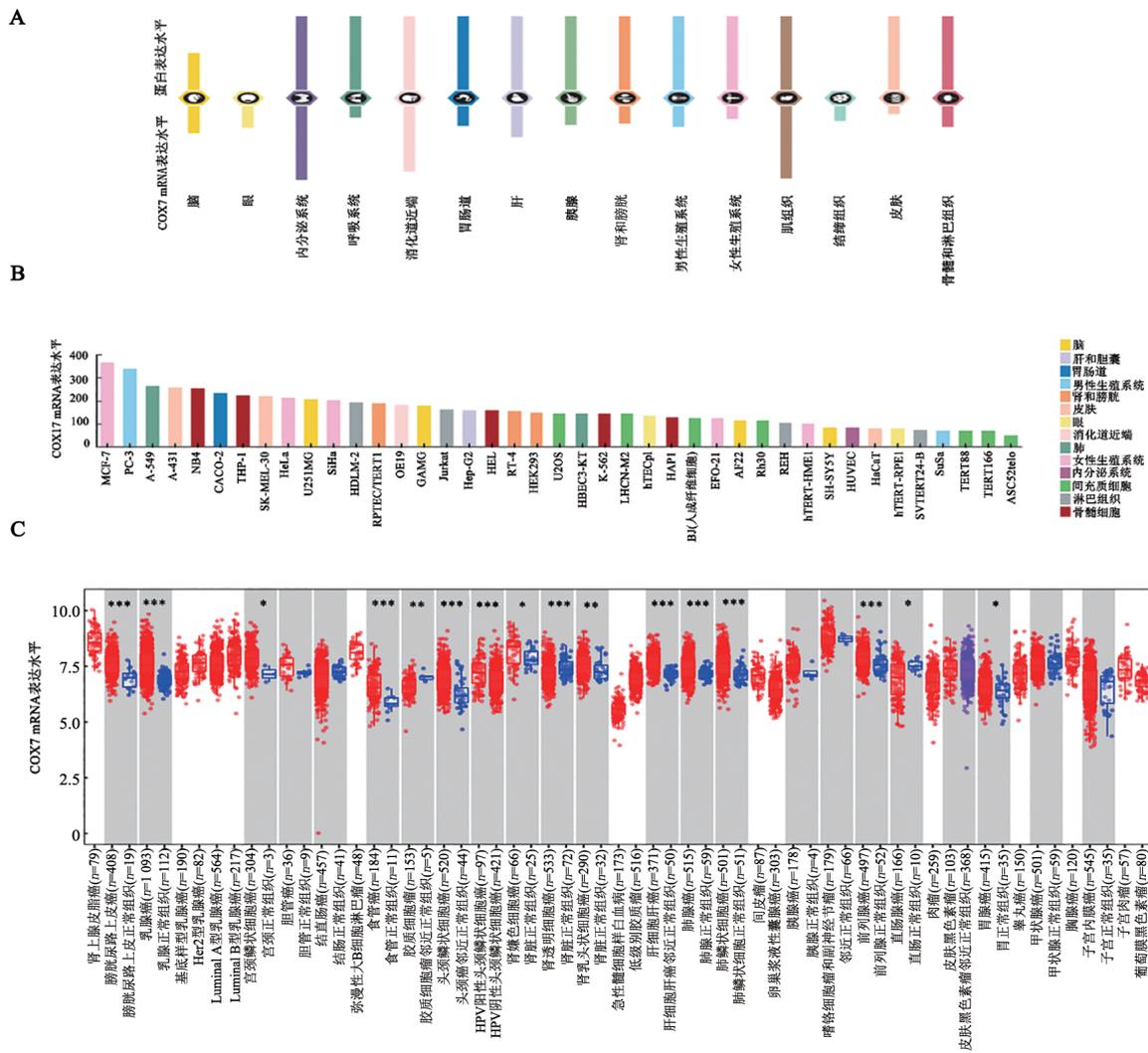
通过 HPA 数据库评估了 COX17 在人乳腺、结直肠、肺、肝、卵巢和宫颈的肿瘤组织和癌旁正常组织中的蛋白表达情况, 结果 (图 2) 显示, COX17 蛋白主要表达于细胞质或细胞膜。与癌旁组织比较, 在上述癌组织中 COX17 蛋白均呈高表达。

2.3 数据库数据分析显示 COX17 mRNA 表达水平明显影响乳腺癌等癌症患者的预后

采用 Kaplan-Meier 数据库分析 COX17 表达水平与患者 OS 之间的关系, 结果 (图 3) 显示, 与低表达组比较, 高表达组乳腺癌、肾透明细胞癌、头颈鳞状细胞癌和直肠癌患者的 OS 明显缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 而高表达组肝细胞癌、宫颈鳞状细胞癌、卵巢癌、肉瘤样肺癌和胃癌患者的 OS 却明显延长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。分析结果表明, COX17 mRNA 表达高度明显影响着乳腺癌患者的预后。

2.4 COX17 基因在多种癌组织中突变频率高且其主要突变类型为错义突变、扩增和深度缺失

cBioPortal 数据库中主要癌症类型中 COX17 基因突变分析结果 (图 4) 显示, 肺鳞状细胞癌、宫颈鳞状细胞癌、食管腺癌、头颈鳞状细胞癌、卵巢浆液性囊腺癌、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、肉瘤和膀胱尿路上皮癌中突变率最高 (突变率 $>2\%$, 图 4A), COX17 基因突变频率较高的类型分别是错义突变、扩增和深度缺失 (图 4B)。图 4C 进一步显示了 COX17 基因修饰的类型、位点和数量。错义突变是 COX17 主要的基因突变类型, 而剪接改变被检测到 2 次。扩增、增益功能和二倍体是 COX17 基因前 3 个常见的假定拷贝数变化 (图 4D)。



A: COX17 mRNA和蛋白在人体正常组织中的表达情况; B: COX17 mRNA在各种癌细胞中的表达水平; C: COX17 mRNA在泛癌组织中的表达。红色表示癌组织, 蓝色表示对应的癌旁; 与癌旁组织比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 COX17 mRNA在正常组织和细胞及泛癌组织细胞中的表达情况

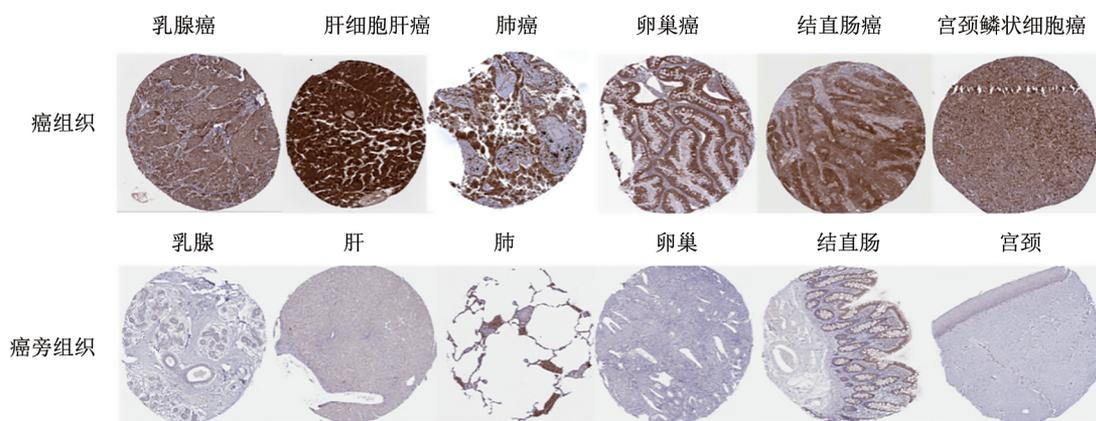
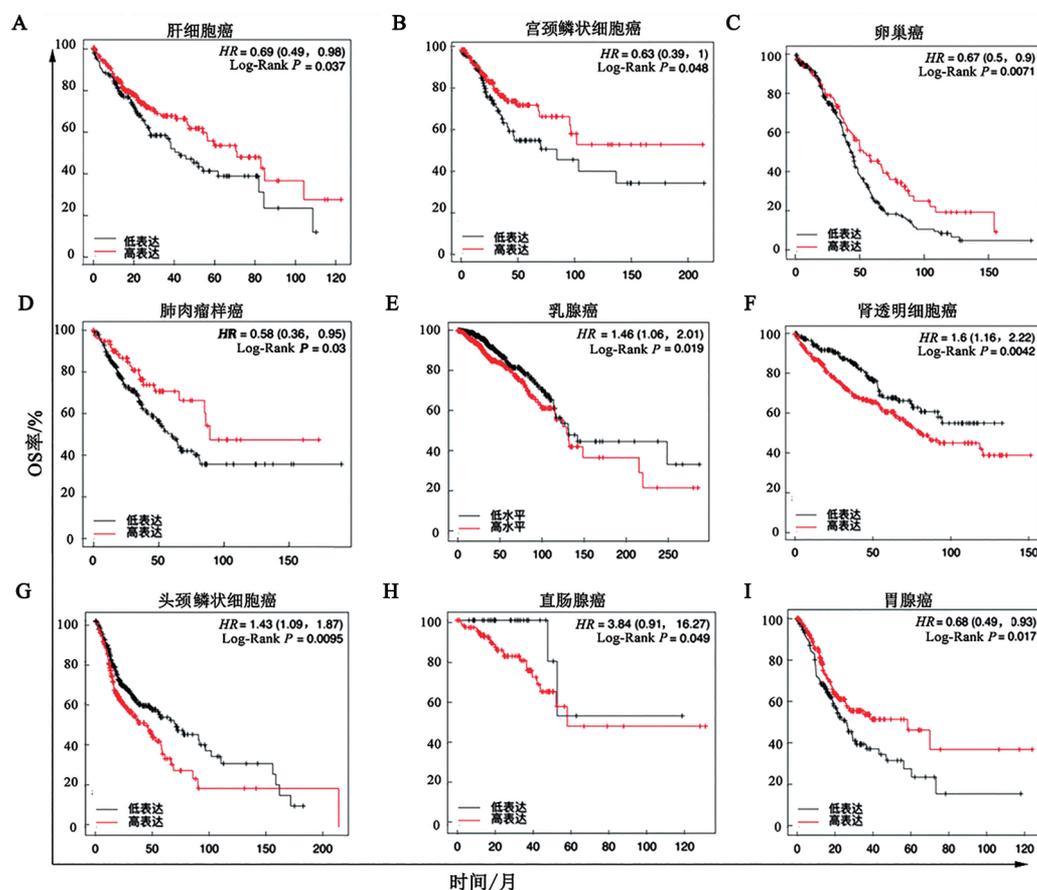


图2 在多种人癌组织和癌旁组织中 COX17 蛋白的表达情况($\times 5$)



A~E: COX17 mRNA 表达水平与肝细胞癌(A)、宫颈鳞状细胞癌(B)、卵巢癌(C)、肺肉瘤样癌(D)、乳腺癌(E)、肾透明细胞癌(F)、头颈鳞状细胞癌(G)、直肠腺癌(H)和胃腺癌(I)患者预后的关系。

图3 COX17 mRNA 表达与泛癌患者 OS 的关系

2.5 数据库数据分析显示 COX17 mRNA 表达水平与多种肿瘤的肿瘤纯度和免疫细胞浸润存在相关性

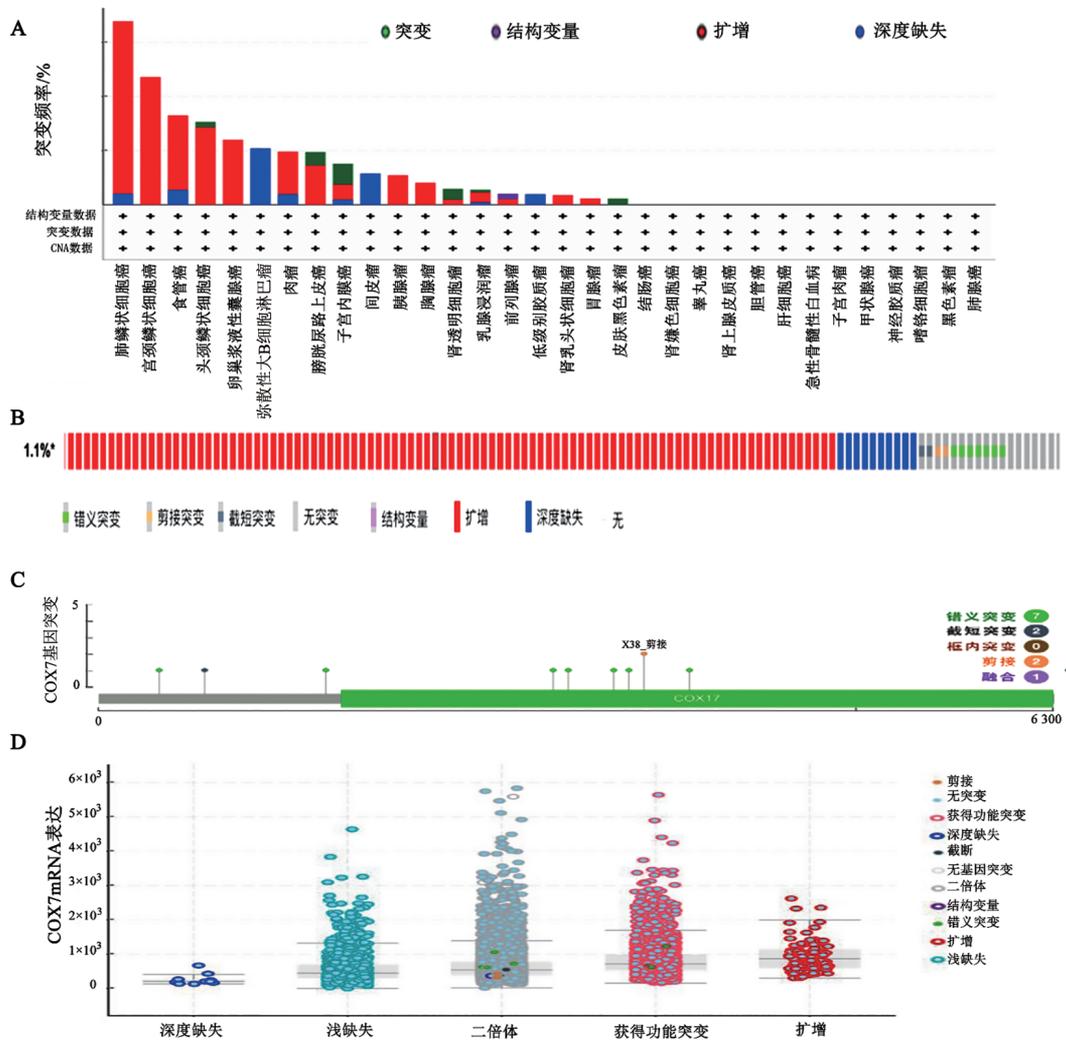
利用TIMER数据库分析了乳腺癌、肺肉瘤样癌、肝癌、宫颈鳞状细胞癌、结直肠癌和卵巢癌等6种癌组织中COX17 mRNA表达水平与肿瘤纯度和6种免疫细胞(B细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和DC)浸润得分的相关性,分析结果(图5)显示,COX17 mRNA表达水平与乳腺癌和肝癌的肿瘤纯度呈明显正相关(均 $P < 0.01$),与其他4种癌的肿瘤纯度均无明显相关性(均 $P > 0.05$)。在乳腺癌组织中COX17 mRNA表达水平与上述6种免疫细胞浸润均呈明显负相关(均 $P < 0.01$);在肺肉瘤样癌组织中,与B细胞和DC浸润水平呈正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在肝癌组织中,与上述6种免疫细胞浸润均无相关性(均 $P > 0.05$);在宫颈鳞癌组织中,与巨噬细胞和DC浸润正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在直肠癌组织中,与CD8⁺ T细胞、巨噬细胞和中性粒细胞浸润正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在卵巢癌组织中,与中性粒细胞浸润呈正相关($P < 0.05$)。分析结果说明,COX17 mRNA表达水平与癌症的肿瘤纯度和免疫细胞浸润有明显的相关性,但不同肿瘤之间存在较大的差异。

2.6 COX17 mRNA 表达水平与乳腺癌临床分期、病理分型、淋巴结转移、患者性别和年龄有关联

采用UALCAN数据库分析结果显示,与正常对照组相比,在乳腺癌中COX17 mRNA呈高表达($P < 0.05$,图6A);COX17 mRNA在1期、2期、3期及4期中的表达均高于正常组织(图6B, $P < 0.05$),在不同分期之间的差异不明显,但是有升高的趋势。在不同病理分型中的表达均显著升高,且COX17 mRNA的表达在Luminal型中的表达水平明显高于HER2阳性与TNBC(图6C, $P < 0.05$);在有淋巴结转移N1组中的表达明显高于无淋巴结转移组(图6D, $P < 0.05$),但是在N2与N3组之间没有明显差异;在男性病例组中的表达高于女性病例组($P < 0.05$,图6E);并随着患者年龄增大其表达升高(图6F, $P < 0.05$)。

2.7 免疫组化检测结果证实在国人乳腺癌组织中COX17蛋白也呈高表达

免疫组化法检测国人乳腺癌及癌旁组织中COX17蛋白表达的结果(图7)显示,与癌旁组织比较,在乳腺癌组织中COX17蛋白表达水平呈明显的高表达($P < 0.01$),COX17蛋白阳性反应主要位于细胞质和细胞膜,呈棕黄色颗粒状。



A: COX17 基因在泛癌中的突变率; B, C: COX17 基因的主要突变与修饰类型; D: COX17 基因常见的拷贝数变化。

图4 COX17 基因在泛癌中的突变情况

2.8 COX17 基因在乳腺癌中遗传突变和修饰特征分布是截断突变和启动子区高度甲基化

基于 cBioportal 数据库, 分析了 COX17 基因在乳腺癌中的突变情况, 结果显示, 截断突变是 COX17 基因在乳腺癌中的主要遗传改变方式 (图 8A)。通过 UALCAN 数据库分析了 COX17 基因甲基化水平, 分型结果 (图 8B) 显示, 与对照组比较, 在乳腺癌中 COX17 基因启动子区域甲基化水平显著升高 ($P < 0.05$)。修饰分型结果表明, COX17 在乳腺癌中高表达可能受 COX17 基因启动子区甲基化修饰的调控。

2.9 COX17 蛋白与 ATOX1 等多种蛋白表达相关且构成复杂的 PPI 网络

用 STRING 数据库构建 COX17 的 PPI 网络有 11 个节点、48 条边, 平均节点度 8.73, PPI 富集 P 值为 1.0×10^{-16} 。PPI 富集相互作用的蛋白有 ATOX1、SCO1、COX11、COX19、CHCHD4、COA6、GFER、CHCHD7、TIMMBA 与 TIMM13 (图 9A)。为了进一

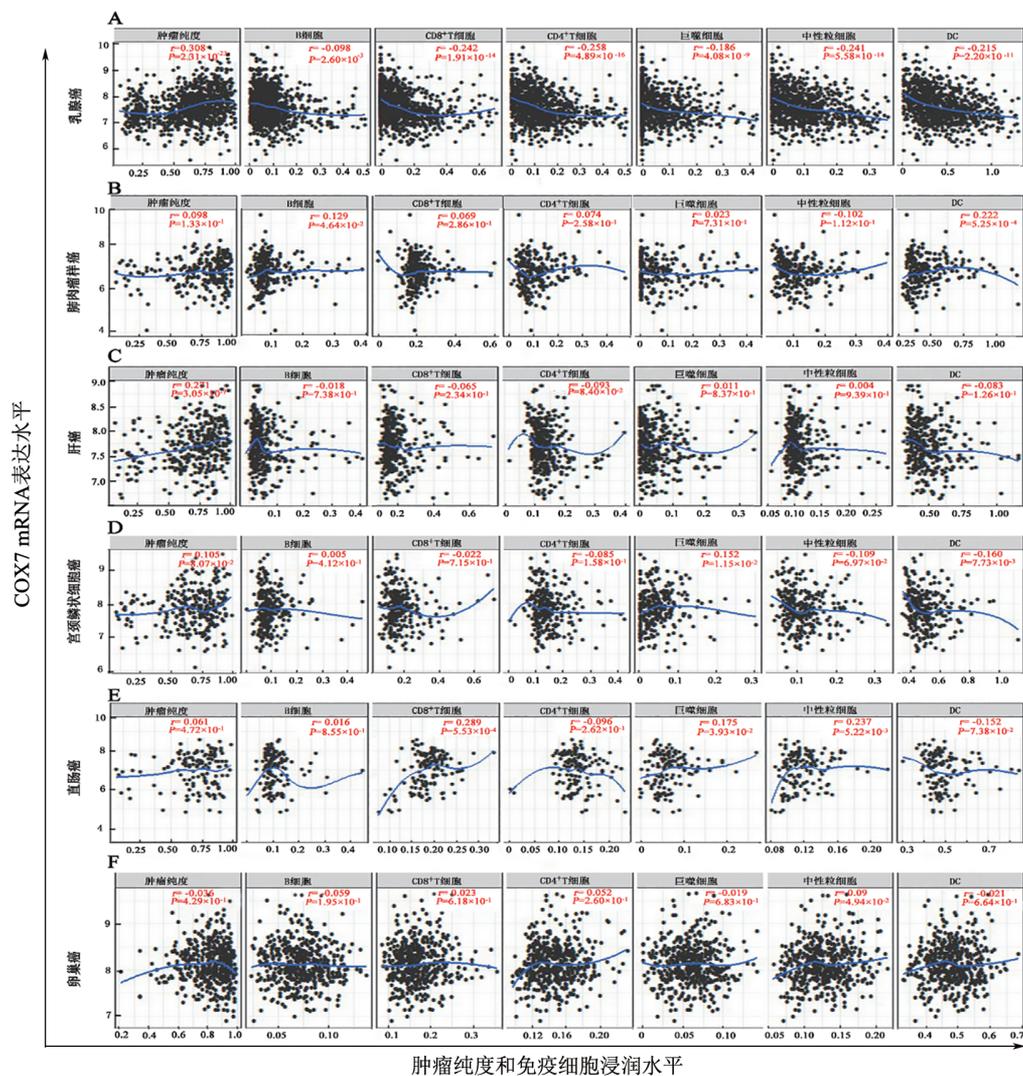
步研究 COX17 在乳腺癌中的分子机制, 筛选出 10 个 COX17 的靶向结合蛋白及与 COX17 表达相关的 10 个基因, 然后在 GEPIA 平台上进行相关性分析。分析结果 (图 9B~K) 显示, COX17 表达水平与 ATOX1、COX11、TIMM13、CHCHD4、COA6、GFER 和 TIMM8A 蛋白的表达水平呈正相关 (均 $P < 0.01$)。此外, 与 COX19 蛋白的表达水平呈负相关 ($P < 0.01$)。

2.10 COX17 在乳腺癌中相关差异性表达基因主要涉及氧化还原酶活性、蛋白翻译、氧化磷酸化及 TNF 信号通路等生物过程

用 LinkedOmics 数据库分析 COX17 在乳腺癌中差异性表达基因, 筛选出差异显著 ($P < 0.05$) 且关联最紧密的前 50 基因绘制热图。热图显示, 在乳腺癌中, 与 COX17 表达呈显著正相关的基因有 TBCA、EMP2 与 MDP-1 等 (图 10A); 与 COX17 表达呈显著负相关的基因有 CLCN4、ZNF667 与 KARS 等 (图 10B)。然后将这 50 个基因进行 GO 功能富集和 KEGG 分析, 结果 (图 10C~E) 显示, 这些基因主要富集在 NAD(P)H

的氧化还原酶活性、蛋白质翻译延伸阶段和吞噬作用等生物学过程;KEGG 主要富集在氧化磷酸化作用、JAK-STAT 与 TNF 等信号通路(图 10F)。分析结

果说明,COX17 与其差异表达基因可能通过上述的生物学过程与信号通路调控乳腺癌发生发展过程。



A~F: COX17 mRNA 表达水平与乳腺癌(A)、肺癌样癌(B)、肝癌(C)、宫颈鳞状细胞癌(D)、直肠癌(E)和卵巢癌组织(F)中的肿瘤纯度和免疫细胞浸润的相关性分析。

图5 数据库数据分析显示 COX17 mRNA 表达与多种肿瘤的肿瘤纯度和免疫细胞浸润的相关性

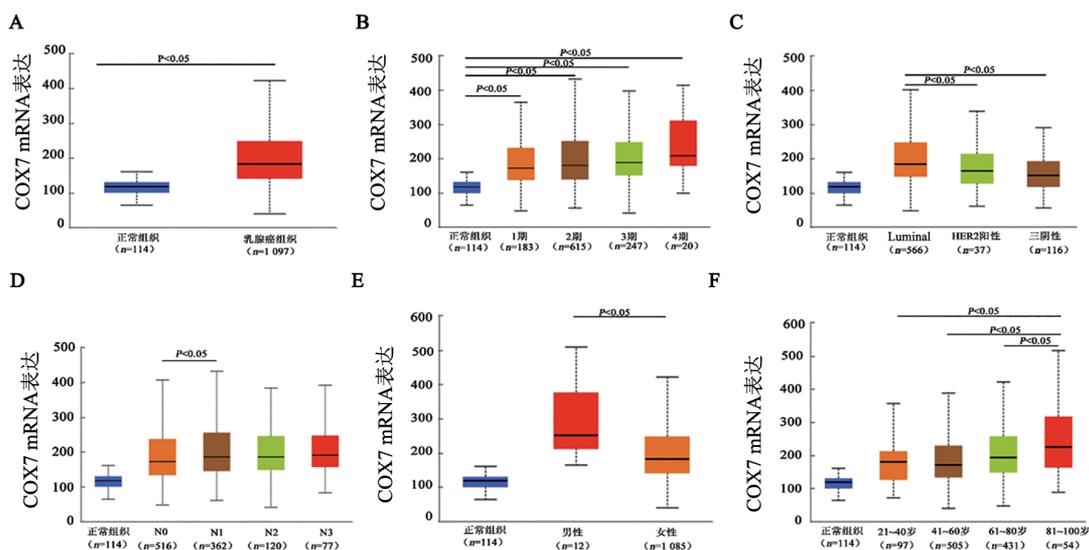
3 讨论

铜依赖性死亡是一种新近发现的细胞死亡方式。伊利司莫(elesclomol)是一种将铜转移到细胞内的铜离子载体,它可以诱导细胞铜死亡^[17]。细胞内铜过载可促进TCA 中脂酰化蛋白的聚集和FeS簇蛋白的不稳定,最终导致细胞死亡^[1]。作为一种新型调控性细胞死亡机制,铜死亡在肿瘤治疗领域具有可观的应用前景。铜死亡相关分子COX17是线粒体中关键铜伴侣蛋白,负责将铜离子转运至线粒体^[2]。其在心、大脑和肾等代谢旺盛组织中的表达显著高于其他组织,乳腺癌患者血清中铜离子含量高于正常

人^[18]。铜离子能直接结合并促进血管生成因子的表达,从而促进肿瘤组织的血管生成,还能激活肿瘤细胞的增殖、代谢相关的蛋白酶,从而影响肿瘤细胞侵袭与转移^[19]。近年来,COX17与肿瘤相关性研究逐渐增多。在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中,COX17在其组织和细胞中呈高表达,其表达产物对于NSCLC细胞的生长不可或缺,进而影响了肺癌的发生发展^[20-21]。研究^[22]发现,上皮性卵巢癌具有高度侵袭性预后较差,COX17是上皮卵巢癌中的枢纽基因,其可作为上皮卵巢癌的潜在生物标志物。COX17已被证明可促进顺铂向线粒体的递送^[23]。ZHAO等^[24]在一项抗肿瘤药物相关的研

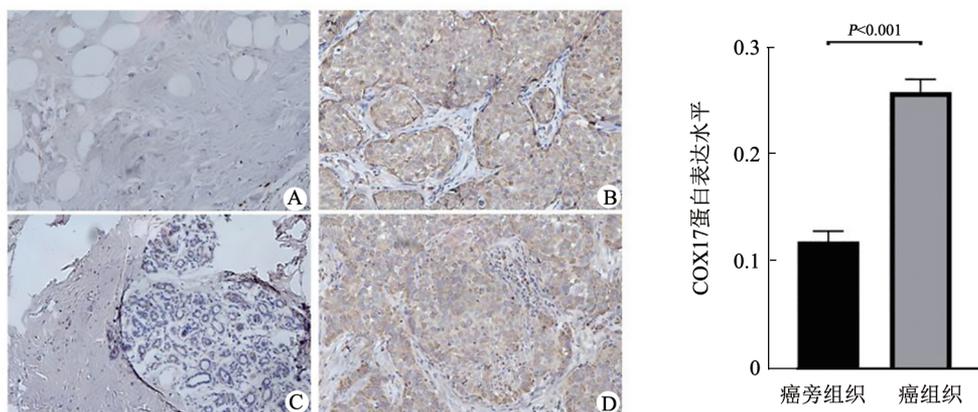
究中发现,COX17具有类似谷胱甘肽的反应性,超过90%的顺铂可以与COX17结合,这进一步说明了COX17在抗肿瘤药物中的重要作用。此外,在急性髓系白血病中,抑制肝再生增长因子和COX17会增加线粒体中铜水平,进而抑制S-腺苷同型半胱氨酸水解酶和较低水平的S-腺苷蛋氨酸,从而降低白血病干细胞的活力^[25]。COX17在人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)阳性头颈癌中也具有重要意义。研究^[26]发现,与HPV阴性癌相比,HPV阳性癌参与糖酵解的基因表达水平较低,参与TCA、氧

化磷酸化和 β 氧化的基因表达水平较高,COX17等代谢相关基因的表达降低仅在HPV阳性组织中与改善患者生存率相关。因此,在HPV阳性头颈癌中,COX17的低表达是总体生存率的重要因素,其低表达与更好的生存率相关,所以COX17可能作为HPV阳性头颈癌的新治疗靶点。此外,WANG等^[27]发现,在肝细胞癌中,COX17的表达可能与免疫细胞浸润和免疫检查点的表达密切相关。上述研究提示COX17表达可能与肿瘤恶性进展有关。



A:COX17 mRNA在乳腺癌与癌旁组织中的表达水平;B:COX17 mRNA在乳腺癌不同临床分期的表达水平;C:COX17 mRNA在乳腺癌不同亚型中的表达水平;D:COX17 mRNA在不同淋巴结转移的乳腺癌中的表达水平;E:COX17 mRNA在不同性别的乳腺癌中的表达水平;F:COX17 mRNA在不同年龄段的乳腺癌中的表达水平。

图6 COX17 mRNA表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系



A、C:COX17蛋白在乳腺癌旁组织中的表达情况($\times 200$);B、D:COX17蛋白在乳腺癌组织中的表达($\times 200$)。

图7 免疫组织化学法检测COX17蛋白在乳腺癌和癌旁组织中的表达

本研究通过多种数据库分析COX17在乳腺癌及多种肿瘤中的表达水平及临床意义,且通过免疫组化检测国人乳腺癌标本加以验证。结果发现,COX17在乳腺癌、膀胱移行细胞癌、宫颈鳞癌、食管

癌、头颈鳞状细胞癌、肾嫌色细胞癌、肾透明细胞癌、肝细胞癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、前列腺癌和胃癌等肿瘤中均呈明显高表达。Kaplan-Meier数据库分析发现,高表达的COX17 mRNA是乳腺癌患者预

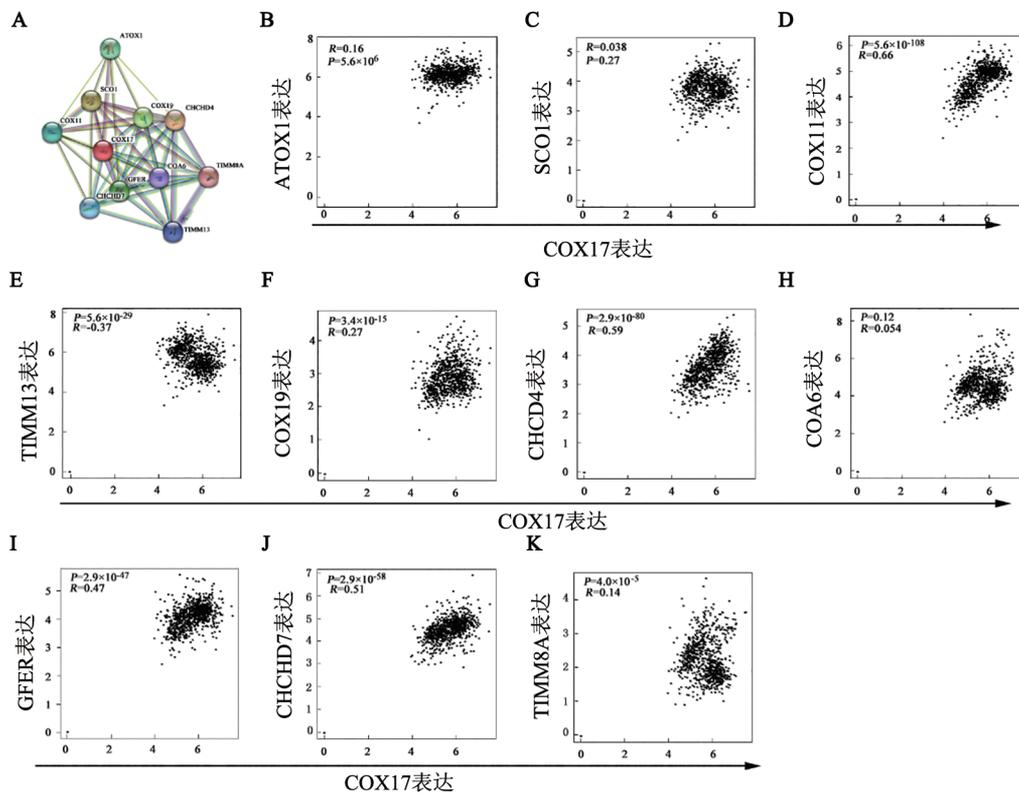
后的不利因素,提示COX17表达可能在乳腺癌患者的预后中起重要作用。cBioPortal数据库分析结果显示,与其他类型癌症相比,在肺鳞状细胞癌、宫颈鳞状细胞癌、食管腺癌、头颈鳞状细胞癌、卵巢浆液性囊腺癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肉瘤和膀胱尿路上皮癌组织中COX17基因突变率最高。通过TIMER2.0数据库发现,在乳腺癌、肺肉瘤样癌、宫颈鳞状细胞癌、结直肠癌和卵巢癌等5种癌症中,COX17基因的表达与B细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和DC的浸润水平有相关性,且在乳腺癌中,COX17基因的表达与以上6种免疫细胞浸润水平呈负相关。本研究还发现,免疫浸

润分析与预后分析显示COX17在乳腺癌中的潜在作用。所有这些结果表明,乳腺癌是最有可能应用针对COX17相关铜死亡的手段进行治疗的肿瘤。同时,在对31例乳腺癌组织与癌旁组织进行的免疫组化实验中,证实了COX17在乳腺癌中的表达高于癌旁组织。此外,本研究在UALCAN等多种数据库中分析发现,COX17与乳腺癌多种临床特征与甲基化水平密切相关。通过STRING数据库发现,ATOX1、SCO1、COX11、COX19、CHCHD4、COA6、GFER、CHCHD7、TIMMBA与TIMM13是与COX17联系最紧密的互作蛋白。



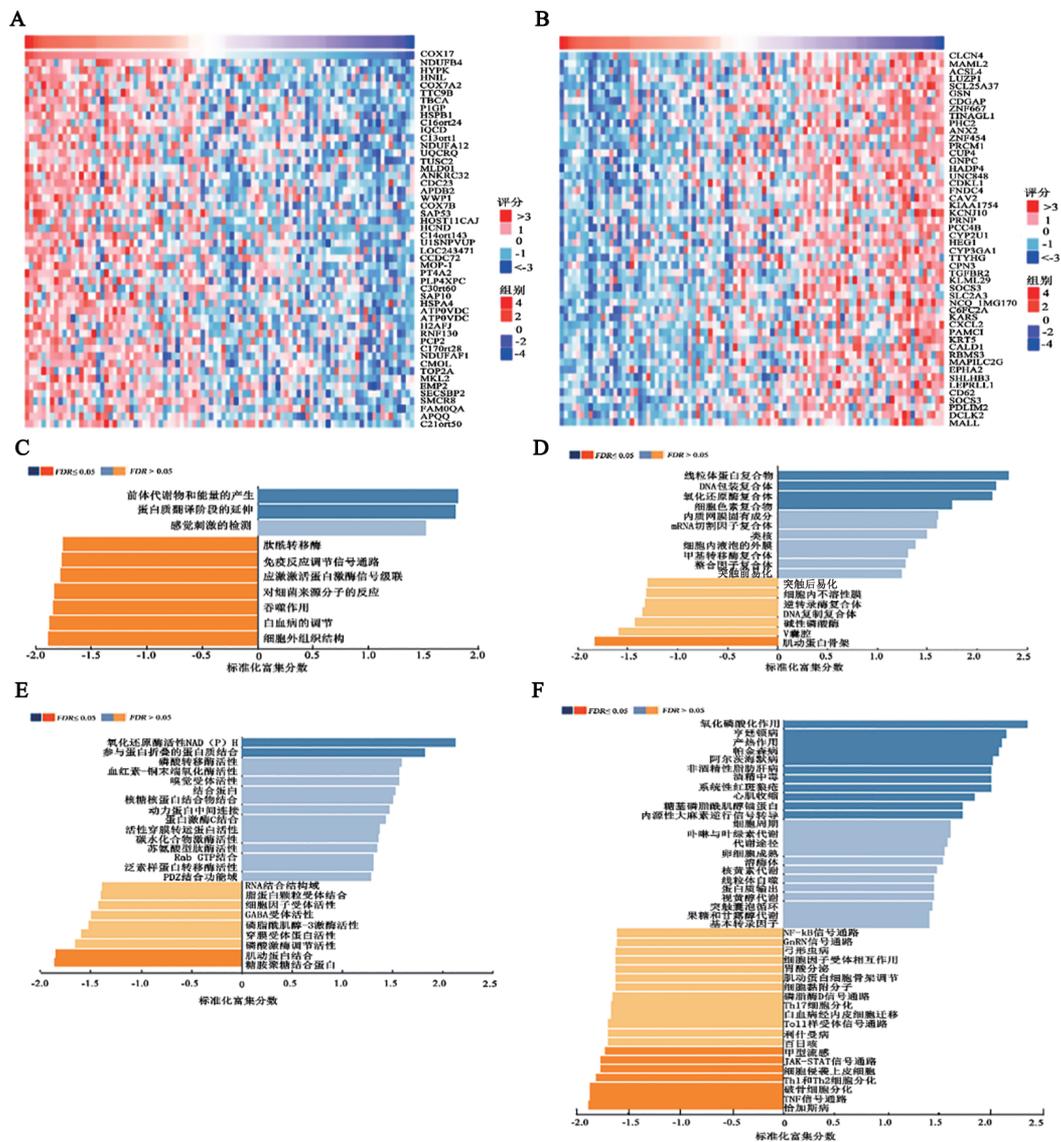
A: COX17基因在乳腺癌中遗传突变的情况;B:在乳腺癌中COX17基因启动子区甲基化水平分析。*β值(甲基化水平)=(甲基化信号强度/未甲基化信号强度)。

图8 COX17基因遗传突变和乳腺癌组织和癌旁组织中COX17基因启动子区甲基化的比较



A: COX17基因PPI网络;B-K: COX17表达与ATOX1(B)、SCO1(C)、COX11(D)、TIMM13(E)、COX19(F)、CHCHD4(G)、COA6(H)、GFER(I)、CHCHD7(J)、TIMM8A(K)表达的相关性。

图9 COX17蛋白PPI网络构建与互作蛋白分析



A: 乳腺癌中与COX17呈正相关的前50个基因; B: 乳腺癌中与COX17呈负相关的前50个基因; C~E: GO分析在乳腺癌中COX17差异表达基因参与的生物学过程; F: KEGG分析在乳腺癌中COX17共表达基因参与生物学过程。

图10 COX17在乳腺癌中相关差异性表达基因筛选及功能富集分析

乳腺癌预后较差,且容易复发。本研究已证实COX17与患者预后有关,且是乳腺癌预后的独立危险因素。为了进一步探索COX17影响乳腺癌患者预后的作用机制,本研究对COX17与其在乳腺癌中的共表达基因进行了GO与KEGG分析。研究发现,这些基因可能参与NAD(P)H等氧化还原酶活性及氧化磷酸化作用,且可能通过JAK-STAT与TNF等信号通路调控乳腺癌的发生与发展。

综上所述,COX17在泛癌中表达异常,可影响泛癌预后,并与肿瘤免疫细胞浸润等相关,这些发现可能提供一种新的抗肿瘤策略。另外,通过乳腺癌组织公共数据集与免疫组化实验的分析表明,COX17高表达与乳腺癌患者的不良预后有关,且为乳腺癌患者预后的独立危险因素,提示COX17可能通过铜死亡等典型的通路影响乳腺癌的发生发展。然而,

COX17在乳腺癌等恶性肿瘤中表达异常的分子机制尚不清楚,还需进一步开展更多的体内外实验进行探索,为乳腺癌治疗提供潜在有效的靶点。

[参考文献]

[1] 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. DOI: 10.1126/science.abf0529.

[2] PALUMAA P, KANGUR L, VORONOVA A, *et al.* Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase [J]. Biochem J, 2004, 382(1): 307-314. DOI: 10.1042/bj20040360.

[3] MAXFIELD A B, HEATON D N, WINGE D R. Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane[J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 5072-5080. DOI: 10.1074/jbc.m311772200.

[4] FERGUSON-MILLER S, BABCOCK G T. Heme/copper terminal oxidases[J]. Chem Rev, 1996, 96(7): 2889-2908. DOI: 10.1021/cr950051s.

- [5] HORVATH R, LOCHMÜLLER H, STUCKA R, *et al.* Characterization of human SCO1 and COX17 genes in mitochondrial cytochrome-c-oxidase deficiency[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 530-533. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3495.
- [6] LIU H R, TANG T. Pan-cancer genetic analysis of cuproptosis and copper metabolism-related gene set[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 952290[2023-08-10]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.952290>. DOI: 10.3389/fonc.2022.952290.
- [7] RAMCHANDANI D, BERISA M, TAVAREZ D A, *et al.* Copper depletion modulates mitochondrial oxidative phosphorylation to impair triple negative breast cancer metastasis[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12: 7311[2023-08-10]. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27559-z>. DOI: 10.1038/s41467-021-27559-z.
- [8] LI T W, FAN J Y, WANG B B, *et al.* TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J/OL]. *Cancer Res*, 2017, 77(21): e108-e110. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-0307>. DOI: 10.1158/0008-5472.can-17-0307.
- [9] LI B, SEVERSON E, PIGNON J C, *et al.* Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy[J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 1-16. DOI: 10.1186/s13059-016-1028-7.
- [10] LUO L X, ZHENG Y S, LIN Z P, *et al.* Identification of SHMT2 as a potential prognostic biomarker and correlating with immune infiltrates in lung adenocarcinoma[J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 1-18. DOI: 10.1155/2021/6647122.
- [11] LÁNCZKY A, GYÖRFFY B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): development and implementation[J/OL]. *J Med Internet Res*, 2021, 23(7): e27633 [2023-08-10]. <https://doi.org/10.2196/27633>. DOI: 10.2196/27633.
- [12] GAO J J, AKSOY B A, DOGRUSOZ U, *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal[J/OL]. *Sci Signal*, 2013, 6(269): e2004088[2023-08-10]. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>. DOI: 10.1126/scisignal.2004088.
- [13] CHANDRASHEKAR D S, BASHEL B, BALASUBRAMANYA S A H, *et al.* UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658. DOI: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
- [14] VASAIKAR S V, STRAUB P, WANG J, *et al.* LinkedOmics: analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D956-D963. DOI: 10.1093/nar/gkx1090.
- [15] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612. DOI: 10.1093/nar/gkaa1074.
- [16] TANG Z F, KANG B X, LI C W, *et al.* GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W556-W560. DOI: 10.1093/nar/gkz430.
- [17] HUNSAKER E W, FRANZ K J. Emerging opportunities to manipulate metal trafficking for therapeutic benefit[J]. *Inorg Chem*, 2019, 58(20): 13528-13545. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.9b01029.
- [18] SHA S N, SI L Y, WU X R, *et al.* Prognostic analysis of cuproptosis-related gene in triple-negative breast cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 922780[2023-08-10]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.922780>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.922780.
- [19] ZHENG L, HAN P F, LIU J M, *et al.* Role of copper in regression of cardiac hypertrophy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 66-84. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.014.
- [20] MICHALCZYK K, CYMBALUK-PŁOSKA A. The role of zinc and copper in gynecological malignancies[J/OL]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3732[2023-08-10]. <https://doi.org/10.3390/nu12123732>. DOI: 10.3390/nu12123732.
- [21] SUZUKI C, DAIGO Y, KIKUCHI T, *et al.* Identification of COX17 as a therapeutic target for non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7038-7041.
- [22] ESMAEILZADEH A A, KASHIAN M, SALMAN H M, *et al.* Identify biomarkers and design effective multi-target drugs in ovarian cancer: hit network-target sets model optimizing[J/OL]. *Biology*, 2022, 11(12): 1851[2023-08-10]. <https://doi.org/10.3390/biology11121851>. DOI: 10.3390/biology11121851.
- [23] ZHAO L, CHENG Q, WANG Z, *et al.* Cisplatin binds to human copper chaperone Cox17: the mechanistic implication of drug delivery to mitochondria[J]. *Chem Commun (Camb)*. 2014, 50(20): 2667-2669. DOI: 10.1039/c3cc48847k.
- [24] ZHAO L H, WANG Z, WU H, *et al.* Glutathione selectively modulates the binding of platinum drugs to human copper chaperone Cox17[J]. *Biochem J*, 2015, 472(2): 217-223. DOI: 10.1042/bj20150634.
- [25] SINGH R P, JEYARAJU D V, VOISIN V, *et al.* Disrupting mitochondrial copper distribution inhibits leukemic stem cell self-renewal[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(6): 926-937. DOI: 10.1016/j.stem.2020.04.010.
- [26] PRUSINKIEWICZ M A, GAMEIRO S F, GHASEMI F, *et al.* Survival-associated metabolic genes in human papillomavirus-positive head and neck cancers[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(1): 253[2023-08-10]. <https://doi.org/10.3390/cancers12010253>. DOI: 10.3390/cancers12010253.
- [27] WANG X Q, CHEN D F, SHI Y M, *et al.* Copper and cuproptosis-related genes in hepatocellular carcinoma: therapeutic biomarkers targeting tumor immune microenvironment and immune checkpoints [J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1123231[2023-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10157396/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1123231.

[收稿日期] 2023-08-12

[修回日期] 2023-11-19

[本文编辑] 向正华,沈志超