

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.007

· 基础研究 ·

基于蛋白质组学与分子模拟探讨 COX17 参与去甲泽拉木醛抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖和侵袭的作用机制

杨丹¹, 熊心芽², 廖聪慧², 陈洁², 孙杭杭², 韩然³ (1. 贵州省人民医院 检验科, 贵州 贵阳 550002; 2. 遵义医科大学 研究生院, 贵州 遵义 563000; 3. 贵州省人民医院 门诊部, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**探讨细胞色素c氧化酶铜伴侣蛋白17(COX17)是否参与去甲泽拉木醛(DML)抑制胃癌细胞增殖和侵袭的作用。**方法:**采用5、10和20 $\mu\text{mol/L}$ DML处理MGC-803细胞,通过显微镜计数和Transwell实验评价DML对细胞增殖和侵袭的影响;采用标记定量蛋白质组学比较DML处理组与DMSO组的蛋白表达谱,结合差异表达分析和GO功能富集筛选候选蛋白,并采用Western blotting验证DML处理后COX17蛋白表达变化。分别构建COX17敲低和过表达稳定细胞株,通过细胞计数和Transwell实验评价COX17对MGC-803细胞增殖和侵袭的影响。采用分子对接和50 ns分子动力学模拟分析DML与COX17的潜在结合模式及复合物构象稳定性;进一步通过COX17过表达回复实验评价COX17在DML抑制细胞增殖和侵袭过程中的作用。**结果:**DML显著抑制MGC-803细胞增殖和侵袭,且随DML浓度升高,抑制作用逐渐增强(均 $P < 0.0001$)。蛋白质组学共筛选出72个差异表达蛋白,其中21个上调、51个下调;结合差异表达特征、GO功能富集结果及前期研究基础,选取COX17进行后续验证。DML可显著下调MGC-803细胞中COX17蛋白表达($P < 0.0001$)。敲低COX17可抑制细胞增殖和侵袭,过表达COX17则促进上述表型。分子对接提示DML与COX17之间可能存在疏水接触、氢键和盐桥等相互作用,对接评分为-6.8 kcal/mol;分子动力学模拟显示DML-COX17复合物在50 ns模拟过程中整体趋于相对稳定。COX17过表达可部分减弱DML对MGC-803细胞增殖和侵袭的抑制作用($P < 0.01$)。**结论:**DML可抑制MGC-803细胞增殖和侵袭并下调COX17蛋白表达,COX17可能参与DML对胃癌细胞恶性表型的调控。

[关键词] 去甲泽拉木醛;细胞色素c氧化酶铜伴侣蛋白17;胃癌;蛋白质组学;分子动力学模拟

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)08-0867-09

Proteomics and molecular simulation analyses of COX17 involvement in demethylzeylasteral-mediated inhibition of proliferation and invasion of MGC-803 gastric cancer cells

Yang Dan¹, Xiong Xinya², Liao Conghui², Chen Jie², Sun Hanghang², Han Ran³ (1. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. Graduate School, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China; 3. Outpatient Department, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether cytochrome c oxidase copper chaperone 17 (COX17) is involved in the inhibitory effects of demethylzeylasteral (DML) on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. **Methods:** MGC-803 cells were treated with DML at 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$, and the effects of DML on cell proliferation and invasion were evaluated by manual cell counting and Transwell assay, respectively. Label-free quantitative proteomics was applied to compare the protein expression profiles between the DML-treated group and the DMSO group, and candidate proteins were screened by differential expression analysis combined with Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis. The change in COX17 protein expression after DML treatment was verified by Western blotting. COX17-knockdown and COX17-overexpressing stable cell lines were constructed separately, and the effects of COX17 on the proliferation and invasion of MGC-803 cells were evaluated by cell counting and Transwell assay. Molecular docking and 50 ns molecular dynamics simulation were used to analyze the potential binding mode between DML and COX17 as well as the conformational stability of the complex. The role of COX17 in the DML-induced inhibition of cell proliferation and invasion was further evaluated by a COX17 overexpression rescue experiment. **Results:** DML significantly inhibited the proliferation and invasion of MGC-803 cells, and the inhibitory effect was progressively enhanced with increasing DML concentration (all $P < 0.0001$). A total of

[基金项目] 贵州省高层次创新型人才“千层次”人才培养项目(GZSYQCC[2020]009)

[作者简介] 杨丹(1984—),女,博士,副主任技师

[通信作者] 韩然(扫码获取作者通信方式)



72 differentially expressed proteins were screened by proteomics, of which 21 were upregulated and 51 were downregulated. Based on these differential expression characteristics, the GO enrichment results and our previous findings, COX17 was selected for further validation. DML significantly downregulated COX17 protein expression in MGC-803 cells ($P < 0.0001$). Knockdown of COX17 inhibited cell proliferation and invasion, whereas overexpression of COX17 promoted these malignant phenotypes. Molecular docking suggested that interactions such as hydrophobic contacts, hydrogen bonds and salt bridges might exist between DML and COX17, with a docking score of -6.8 kcal/mol. Molecular dynamics simulation showed that the DML-COX17 complex tended to be relatively stable overall during the 50 ns simulation. Overexpression of COX17 partially attenuated the inhibitory effects of DML on the proliferation and invasion of MGC-803 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** DML can inhibit the proliferation and invasion of MGC-803 cells and downregulate COX17 protein expression, and COX17 may be involved in the regulation of the malignant phenotypes of gastric cancer cells by DML.

[Key words] demethylzeylasteral (DML); cytochrome c oxidase copper chaperone 17 (COX17); gastric cancer; proteomics; molecular dynamics simulation

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(8): 867-875. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.08.007]

2022年,中国新发胃癌病例和死亡病例分别占全球病例的37.0%和39.4%^[1],防治形势严峻。虽然近年来手术、放化疗联合靶向及免疫治疗的策略有所进展,但胃癌早期症状隐匿,胃癌患者总体生存率未见显著改善^[2-3]。从天然产物中寻找新型抗肿瘤活性成分是肿瘤药物研究的热点,人参皂苷Rg3^[4]、汉黄芩素^[5]和雷公藤红素^[6]等均被证实可通过不同信号通路抑制胃癌细胞恶性表型。去甲泽拉木醛(demethylzeylasteral, DML)是从雷公藤根皮中分离的酚型去甲基三萜类化合物,有研究表明其在胃癌^[7]、肺癌^[8]、结直肠癌^[9]中均表现出抗肿瘤效应。DML能靶向乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA),阻断组蛋白乙酰化修饰,进而抑制肝癌干细胞的恶性生物学行为^[10]。本课题组前期研究表明,DML处理后,胃癌干细胞中细胞色素c氧化酶铜伴侣蛋白17(cytochrome c oxidase copper chaperone 17, COX17)的表达有显著变化^[11],但COX17在胃癌细胞中的生物学功能尚不明确,其是否是DML直接作用的关键靶点,目前也无直接证据。本研究综合运用蛋白质组学筛选差异蛋白、分子对接、分子动力学模拟及体外功能实验,以COX17为切入点,解析DML抑制胃癌细胞增殖和侵袭中的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与细胞来源

DML(HPLC $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司,使用时用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配制成50 mmol/L DML原液,于 -20°C 冰箱保存。基于课题组前期测定DML对MGC-803细胞的 IC_{50} 为 $5.9\text{ }\mu\text{mol/L}$ ^[11],因此本研究设置不同DML浓度用于后续实验。其中, $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ DML用于蛋白质组学分析,以观察低浓度干预下的早期蛋白表达变化; 5 、 10 和 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ DML用于细胞功能实验,以评价DML对胃癌细胞增殖和侵袭能力的影响;

$10\text{ }\mu\text{mol/L}$ DML用于回复实验,以观察药物抑制效应和COX17过表达后的回复效应。

人胃癌细胞MGC-803由重庆医科大学馈赠,DMEM培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清均购自美国Gibco公司,青-链霉素双抗购自美国Thermo Fisher Scientific公司,嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司,EASY-nLC™ 1200纳流超高效液相色谱系统、Q Exactive™ HF-X质谱仪购自美国Thermo公司,COX17抗体购自美国Abcam公司(稀释比例为1:1 000), β -actin(内参)抗体购自美国CST公司(稀释比例为1:1 000),COX17 shRNA慢病毒、阴性对照shRNA慢病毒均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司,使用载体为GV493,shRNA序列信息见表1。COX17过表达慢病毒载体(GV492载体)亦由上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建,插入目的基因为人COX17全长编码序列,序列经测序验证正确。

表1 COX17 shRNA及阴性对照序列

shRNA	序列
shCOX17-1	5'-GCATGAGAGCCCTAGGATTTA-3'
shCOX17-2	5'-ACATCTAATTGAGGCCACAA-3'
shCOX17-3	5'-GCGCTTGCCCGGAGACCAAGA-3'
shRNA-NC	5'-TTCCTCCAACGTGTACAGT-3'

1.2 胃癌细胞培养及COX17敲低和过表达稳定细胞模型的构建

MGC-803细胞采用含10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗的DMEM完全培养基于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期细胞用于后续处理。

采用shRNA慢病毒感染法构建COX17敲低稳定细胞。感染阴性对照shRNA-NC慢病毒的细胞设为sh-NC组,感染不同COX17 shRNA慢病毒的细胞分别设为shCOX17-1、shCOX17-2和shCOX17-3组。采用慢病毒感染法构建COX17过表达稳定细胞模

型,感染空载体慢病毒的细胞设为 Vector 组,感染 COX17 过表达慢病毒的细胞设为 OE 组,不做任何处理的 MGC-803 细胞设为空白组。

上述慢病毒感染均按相同条件进行。取对数生长期 MGC-803 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板;待细胞汇合度达 30%~40% 时,按 $\text{MOI} = 10$ 加入相应慢病毒液。本实验所用各慢病毒原液滴度: shCOX17-1 为 2×10^9 TU/mL, shCOX17-2 为 4×10^9 TU/mL, shCOX17-3 为 2×10^9 TU/mL, COX17 过表达病毒原液滴度检测结果为 1.5×10^9 TU/mL。感染 12 h 后更换新鲜完全培养基;感染 72 h 后加入嘌呤霉素,终质量浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$,连续筛选 7 d,获得稳定感染细胞。采用 Western blotting 法检测 COX17 敲低和过表达效率。

1.3 显微镜计数法检测 DML 对 MGC-803 细胞增殖的影响

取对数生长期 MGC-803 细胞,消化、重悬并计数,以 3 000 个/孔接种于 6 孔板,每孔加入 DMEM 完全培养基至总体积 2 mL。实验分为 DMSO 组及 5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ DML 组,每组设 5 个复孔。DMSO 组加入含等体积 DMSO 的完全培养基,DML 组分别加入终浓度为 5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 DML,并保证各组 DMSO 终浓度一致。于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,在倒置显微镜下观察细胞生长情况。每孔随机选取 5 个视野采集图像,采用 ImageJ 软件进行细胞计数,以各视野细胞数的平均值作为该孔的计数结果,并进行统计分析。

1.4 Transwell 法检测 DML 对 MGC-803 细胞侵袭能力的影响

将约 1.5×10^3 个/孔细胞接种于 Transwell 小室上室,上室加入无血清培养基,下室加入含 10% FBS 的完全培养基。细胞接种后立即加入 DML 进行干预(终浓度为 5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$),为保证药物作用浓度均一,DML 同时加入上室和下室;对照组加入等体积 DMSO。每组设 3 个复孔。于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,PBS 清洗 2 次,采用 4% 多聚甲醛固定 15~20 min,0.1% 结晶紫染色 20 min。随后用蒸馏水清洗,并用棉签轻轻擦除上室未侵袭细胞,显微镜下随机选取 5 个视野,观察并计数穿膜细胞,采用 ImageJ 软件进行统计分析。

1.5 COX17 过表达回复实验

为验证 COX17 过表达对 DML 抑制效应的回复作用,按照“1.2”节方法分别构建感染空载体对照慢病毒和 COX17 过表达慢病毒的 MGC-803 稳定细胞模型。设置以下 4 个实验组:Vector 组(空载体对照)、Vector + DML 组(空载体 + DML 处理)、OE 组(COX17

过表达)和 OE + DML 组(COX17 过表达 + DML 处理)。

取上述稳定细胞进行细胞增殖和 Transwell 侵袭实验。细胞增殖实验按 3 000 个/孔接种于 6 孔板,每组设 5 个复孔;Transwell 侵袭实验按 1.5×10^3 个/孔接种于 Transwell 小室上室,每组设 3 个复孔。细胞贴壁后,Vector + DML 组和 OE + DML 组加入终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 DML,Vector 组和 OE 组加入等体积 DMSO,并保证各组 DMSO 终浓度一致。

按照“1.3”和“1.4”项下方法分别进行细胞增殖和侵袭检测。细胞增殖实验于 DML 处理后 24 和 48 h 进行细胞计数;Transwell 侵袭实验于 DML 处理 24 h 后进行固定、染色及侵袭细胞计数,以评价 COX17 过表达对 DML 抑制作用的回复效应。

1.6 标记定量蛋白质组学筛选 DML 处理 MGC-803 细胞的差异表达蛋白

以 MGC-803 细胞为实验对象,设 DML 组和 DMSO 对照组。DML 组加入终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 DML,对照组加入等体积 DMSO,处理 24 h 后收集细胞并提取总蛋白。蛋白经酶解后,采用 EASY-nLC™ 1200 纳流超高效液相色谱系统联用 Q Exactive™ HF-X 质谱仪进行液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测。通过 UniProt 数据库(网址: <https://www.uniprot.org/>)进行蛋白注释并获得各样本蛋白表达谱。差异表达蛋白筛选标准为差异倍数(fold change, FC) ≥ 2.0 且 $P \leq 0.05$ (上调),或 $\text{FC} \leq 0.50$ 且 $P \leq 0.05$ (下调)。随后对差异表达蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析。

1.7 Western blotting 法检测 DML 对 MGC-803 细胞 COX17 蛋白表达的影响

收集各组细胞,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30 min,随后于 4°C 、12 000 rpm 条件下离心 15 min,取上清液获得总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。采用 10% SDS-PAGE 分离蛋白,随后转移至 PVDF 膜。PVDF 膜经 TBST 浸泡后,采用快速封闭液于室温封闭 50 min。随后加入相应一抗,于 4°C 反应过夜;TBST 洗膜后加入相应二抗,于 4°C 反应 2 h。再次洗膜后,采用化学发光法检测蛋白条带并进行成像。采用 ImageJ 软件对蛋白条带灰度值进行定量分析,以目的蛋白 COX17 与内参蛋白 β -actin 条带灰度值的比值表示 COX17 蛋白的相对表达水平。

1.8 分子对接预测 DML 与 COX17 的结合模式

从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 DML 的结构数据文件,从蛋白质数据库(网址: <https://www.rcsb.org/>)获取 COX17 蛋白结

构。采用PyMOL 2.3.4软件对COX17蛋白结构进行去水、去配体处理,再经AutoDockTools软件完成加氢和电荷处理。采用AutoDock Vina 1.1.2软件进行DML与COX17分子对接,对接10次并保存评分最低的构象。采用蛋白质-配体相互作用分析工具(protein-ligand interaction profiler, PLIP)和PyMOL软件对对接结果进行分析和可视化。

1.9 分子动力学模拟评价DML-COX17复合物的构象稳定性

对DML-COX17复合物进行50 ns分子动力学模拟,利用GROMACS相关分析模块计算COX17蛋白及DML配体的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)、均方根涨落(root mean square fluctuation, RMSF)、复合物回转半径(radius of gyration, Rg)及溶剂可及表面积(solvent-accessible surface area, SASA),并分析DML与COX17之间的氢键数量及自由能形貌(free energy landscape, FEL),综合评价DML-COX17复合物在模拟过程中的构象

稳定性。

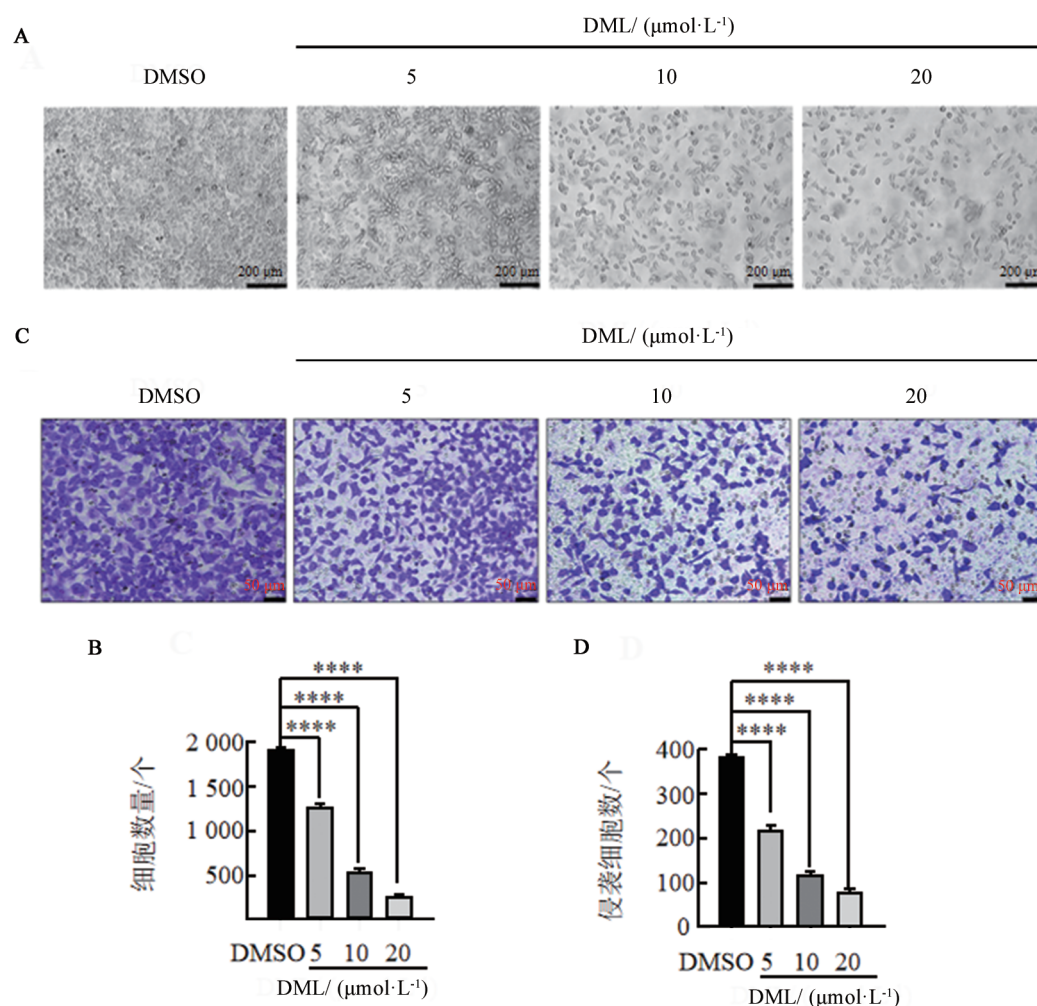
1.10 统计学处理

利用GraphPad Prism 10.0软件对实验数据进行统计分析。每组实验重复3次,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较进一步采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DML抑制MGC-803细胞增殖和侵袭

选用5、10和20 $\mu\text{mol/L}$ DML处理MGC-803细胞。细胞计数实验结果(图1A、B)显示,与DMSO组相比,各DML处理组细胞数均减少(均 $P < 0.0001$),且细胞数随DML浓度升高而逐渐下降。Transwell侵袭实验结果(图1C、D)显示,与DMSO组相比,各DML处理组侵袭细胞数均减少(均 $P < 0.0001$),且侵袭细胞数随DML浓度升高而逐渐下降。



A、B:倒置显微镜观察不同浓度DML处理后MGC-803细胞的生长情况及细胞数统计结果;C、D:Transwell侵袭实验检测不同浓度DML处理后MGC-803细胞的侵袭情况及侵袭细胞数统计结果。与DMSO组比较,**** $P < 0.0001$ 。

图1 DML抑制MGC-803细胞增殖和侵袭

2.2 DML 处理改变 MGC-803 细胞的蛋白表达谱

对 DML 处理组(5 $\mu\text{mol/L}$)和 DMSO 组的 MGC-803 细胞进行标记定量蛋白质组学分析。按照预设筛选标准,共鉴定出 72 个差异表达蛋白,其中上调蛋白 21 个、下调蛋白 51 个(图 2A)。与 DMSO 组相比,DML 处理组中 COX17 蛋白表达显著下调,差异表达倍数为 0.496 (即 DML 组表达量为对照组的 49.6%, $P=0.003$)。

GO 功能富集分析结果(图 2B)显示,差异表达蛋白在细胞组分方面主要富集于线粒体膜间隙、异源三聚体 G 蛋白复合物及膜内在组分等;在分子功能方面主要涉及细胞骨架蛋白结合、铜离子伴侣活性等;在生物学过程方面主要涉及蛋白质折叠、小分子生物合成和胆固醇生物合成等。结合 COX17 的差异表达特征、线粒体铜伴侣蛋白功能及课题组前期研究中 DML 与 COX17 表达变化的关联,本研究将 COX17 列为优先验证的候选作用相关蛋白,并在后续实验中评价其生物学功能及其与 DML 作用的关系。

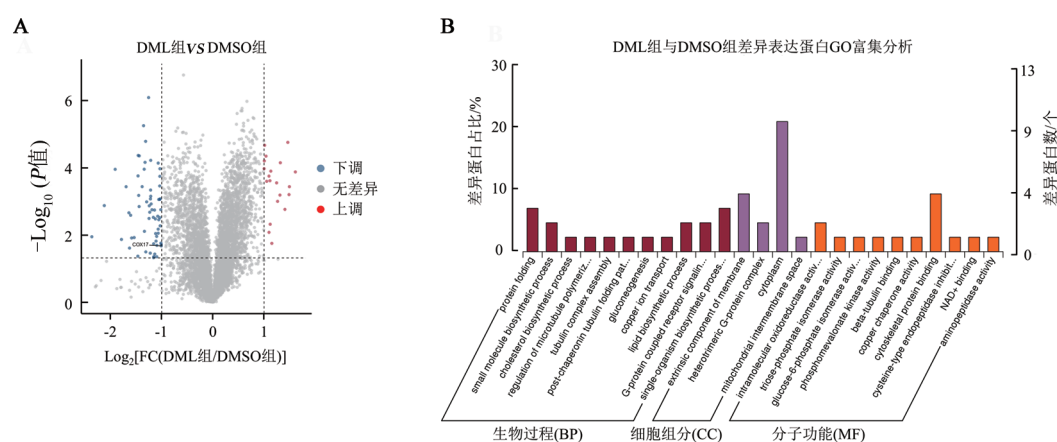
2.3 DML 下调 MGC-803 细胞中 COX17 蛋白表达

采用 Western blotting 法检测 MGC-803 细胞中 COX17 蛋白表达。结果显示,与 DMSO 组相比,不同浓度 DML 处理组 COX17 蛋白表达水平均降低(图 3, $P<0.0001$),表明 DML 可下调 MGC-803 细胞中 COX17 蛋白表达。

2.4 COX17 敲低抑制而过表达促进 MGC-803 细胞增殖和侵袭

采用 Western blotting 法检测 COX17 敲低和过表达效率。结果(图 4)显示,3 条 COX17 shRNA 序列均可降低 COX17 蛋白表达,而 COX17 过表达组蛋白表达水平升高($P<0.01$ 、 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$)。

检测 COX17 敲低和过表达细胞培养 24 及 48 h 后的生长情况。倒置显微镜观察和细胞计数结果(图 5A、C, $P<0.0001$)显示,与相应对照组比较,各 COX17 敲低组细胞数减少,而 OE 组细胞数增加。Transwell 实验结果(图 5B、D,均 $P<0.0001$)显示,与相应对照组比较,COX17 敲低组侵袭细胞数减少,而 COX17 过表达组侵袭细胞数增加。



A: DML 组与 DMSO 组差异表达蛋白火山图; B: 差异表达蛋白 GO 功能富集分析。

图 2 DML 处理后 MGC-803 细胞差异表达蛋白及 GO 功能富集分析

2.5 分子对接和分子动力学模拟提示 DML 与 COX17 可能存在相互作用

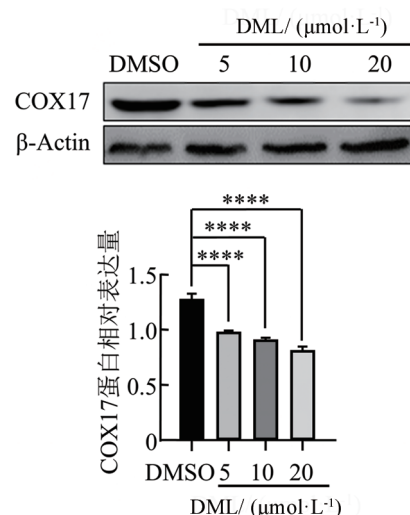
分子对接结果(图 6)提示,DML 可能与 COX17 蛋白的 Lys34、Asp38 和 His56 形成疏水接触,与 Thr33 可能存在氢键作用,与 Arg37 和 His56 可能存在盐桥作用。AutoDock Vina 对接评分为 -6.8 kcal/mol,提示 DML 与 COX17 可能具有一定亲和性。DML 预测结合位点位于 COX17 半胱氨酸富集区附近,推测可能影响其局部构象;该结果为 DML 与 COX17 潜在相互作用提供了结构模拟依据,但仍需进一步验证。

为评价 DML-COX17 复合物的构象稳定性,本研究进行了 50 ns 分子动力学模拟。RMSD 分析结果(图 7A)显示,COX17 蛋白 RMSD 在 0~25 ns 内波

动,随后稳定在约 1.1 nm;DML 配体 RMSD 在后期主要维持在 1.6~1.9 nm。RMSF 分析(图 7B)显示,COX17 蛋白大部分残基 C α 原子的 RMSF 低于 0.5 nm,提示模拟过程中蛋白整体构象相对稳定。Rg 分析(图 7C)显示,复合物 Rg 在模拟前期下降,约 10 ns 后稳定在 1.4 nm 左右。SASA 分析(图 7D)显示,总表面积、疏水表面积和亲水表面积在模拟前期下降,随后趋于稳定。氢键分析(图 7E)显示,模拟后期 DML-COX17 复合物氢键数主要维持在 2~3 个。FEL 分析(图 7F)显示,复合物存在相对集中的低能构象区域。综上,分子动力学模拟提示 DML-COX17 复合物在 50 ns 模拟过程中具有一定构象稳定性,但该结果仍需直接结合实验进一步验证。

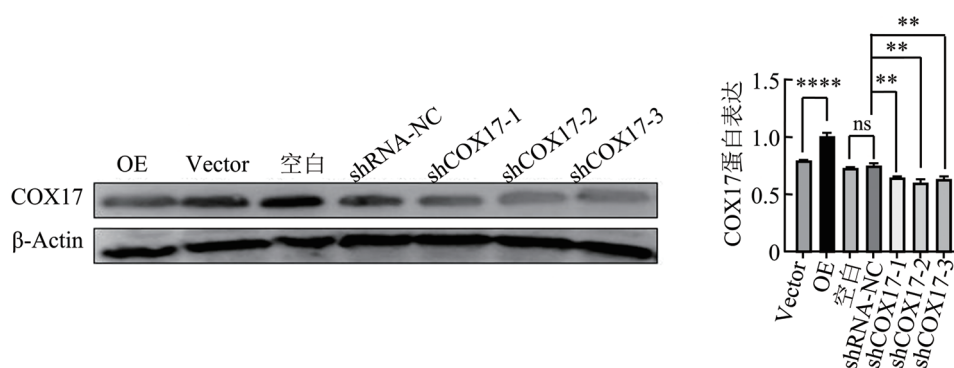
2.6 COX17过表达部分减弱DML对MGC-803细胞增殖和侵袭的抑制作用

细胞计数实验结果(图8A、C)显示,与Vector组相比,COX17-OE组培养24和48 h后的细胞数均增加($P < 0.0001$),而Vector + DML组细胞数减少($P < 0.0001$ 或 $P < 0.01$);与Vector + DML组相比,COX17-OE + DML组培养24 h和48 h后的细胞数均增加($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$)。Transwell侵袭实验结果(图8B、D)显示,与Vector组相比,COX17-OE组侵袭细胞数增加($P < 0.0001$),而Vector + DML组侵袭细胞数减少($P < 0.0001$);与Vector + DML组相比,COX17-OE + DML组侵袭细胞数增加($P < 0.001$)。上述结果表明,COX17过表达可促进MGC-803细胞增殖和侵袭,并可部分减弱DML对细胞增殖和侵袭的抑制作用,提示COX17参与DML对胃癌细胞恶性表型的调控。



Western blotting 法检测 DMSO 组及 5、10 和 20 μmol/L DML 处理组 MGC-803 细胞中 COX17 蛋白表达;与 DMSO 组比较, **** $P < 0.0001$ 。

图3 DML下调MGC-803细胞中COX17蛋白表达



与相应对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图4 Western blotting法检测COX17敲低和过表达效率

3 讨论

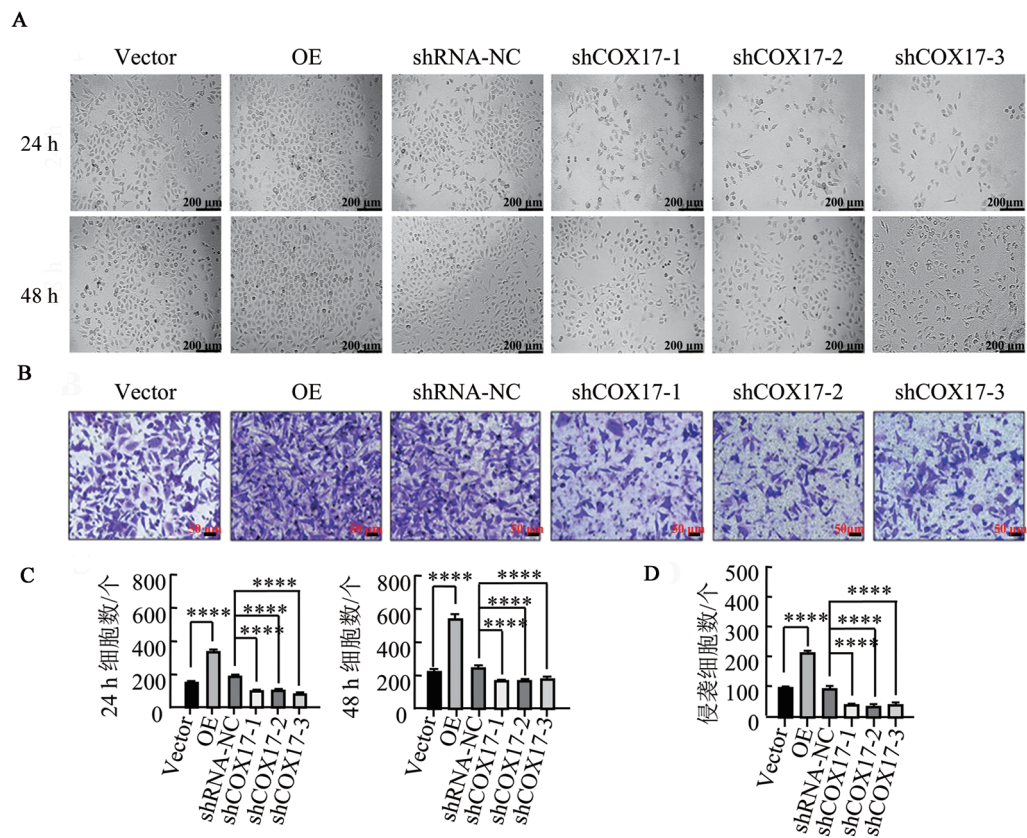
胃癌是全球常见恶性肿瘤之一,发病率和病死率都位居前列^[1]。因此需要开发高效且低毒的抗胃癌活性成分并阐明其作用机制。中药来源单体化合物具有结构多样和多靶点作用等特点,是抗胃癌药物研发的重要候选来源,在提升化疗敏感性、逆转肿瘤耐药方面显示出广阔的应用前景。例如,人参皂苷Rg3能阻断细胞周期关键蛋白E2F-DP异源二聚体形成,诱导胃癌细胞周期停滞和凋亡^[4]。汉黄芩素能够通过下调JAK-STAT3等信号通路,抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[5]。人参皂苷化合物K(ginsenoside compound K, CK)可靶向抑制PI3K/Akt通路,进而逆转胃癌细胞的上皮-间质转化(EMT),克服对奥沙利铂的耐药性^[12]。雷公藤红素则可通过抑制STAT3调控GPX4和SLC7A11,诱导胃癌细胞铁死亡^[6]。雷公藤来源的活性成分因其结构独特、药理作用显著而受到广泛关注,其中DML已被证实

多种肿瘤中具有抗肿瘤活性。在肝癌干细胞中,DML可直接与LDHA结合,抑制LDHA的表达和功能,阻断组蛋白乙酰化修饰,从而抑制肝癌干细胞的恶性生物学行为^[10]。在胃癌中,虽有研究表明DML可通过上调E3泛素连接酶FBXW7的表达,促进c-Myc发生泛素化降解,抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[7],但尚未明确其直接作用靶点,因此需进一步筛选特异性靶蛋白。本研究通过蛋白质组学技术,筛选出DML处理后的差异表达蛋白,并结合功能实验和分子模拟,探讨COX17在DML抑制胃癌细胞增殖和侵袭中的作用。

本实验结果表明,DML可抑制MGC-803细胞的增殖与侵袭能力,且随DML浓度升高,细胞增殖和侵袭能力逐渐下降,与前人研究结果^[7]一致。本研究采用蛋白质组学技术,对DML处理组与DMSO对照组进行差异蛋白筛选,最终鉴定出72个差异表达蛋白。其中COX17为显著下调蛋白之一($FC = 0.496$, $P = 0.003$)。GO功能富集分析显示差异表达蛋白在“线粒体膜间隙”和“铜

离子伴侣活性”等条目中显著富集,这与 COX17 的线粒体铜伴侣蛋白功能高度吻合。上述结果提示 COX17 可能是 DML 作用的相关候选蛋白,但其在胃癌中的生物

学功能尚不明确,因此本研究进一步对其功能及与 DML 作用的关系展开验证。



A、C:倒置显微镜观察 COX17 敲低和过表达后 MGC-803 细胞培养 24 h 和 48 h 的生长情况与定量分析;B、D:Transwell 侵袭实验观察 COX17 敲低和过表达后 MGC-803 细胞的侵袭情况与定量分析;**** $P < 0.0001$ 。

图5 COX17 敲低和过表达对 MGC-803 细胞增殖及侵袭能力的影响

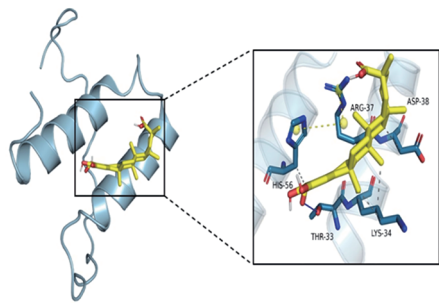
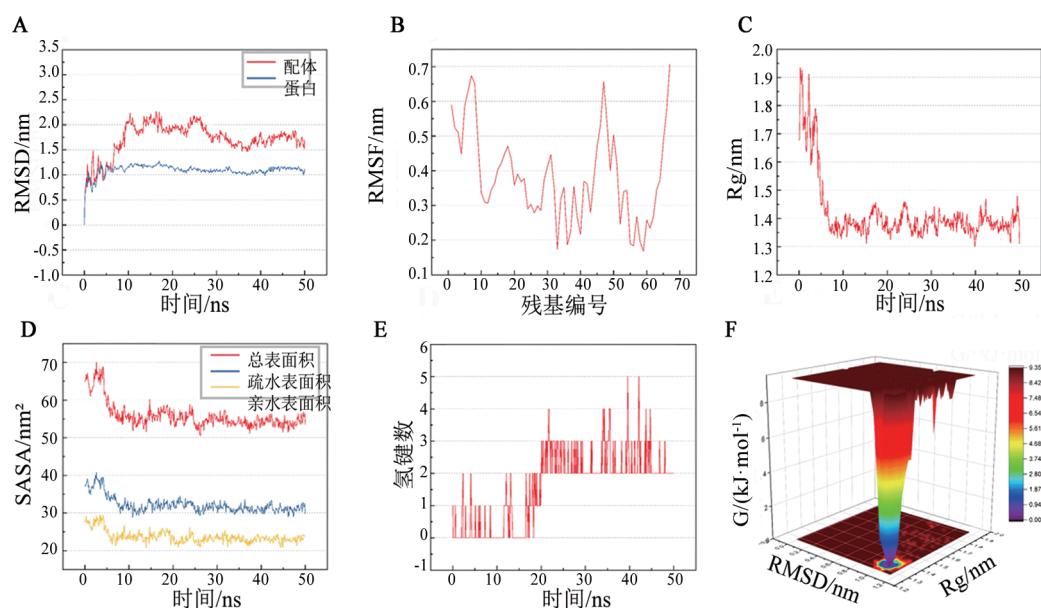


图6 分子对接预测 DML 与 COX17 的结合模式

COX17 作为经典的线粒体铜伴侣蛋白,核心的生理功能是参与铜离子转运和线粒体呼吸链复合体 IV 组装过程^[13-14]。在肾脏纤维化模型中,COX17 也被报道通过维持线粒体铜稳态和复合体 IV 活性发挥保护作用^[15]。既往研究表明,COX17 在胶质母细胞瘤^[16]、结直肠癌^[17]、乳腺癌^[18]、肝细胞癌^[19]等多种恶性肿瘤中高表达,且与肿瘤的发生发展、预后和复发转移密切相关,提示 COX17 在不同疾病背景下具有广泛的生物学功能。本研究通过 shRNA 敲低及过表达

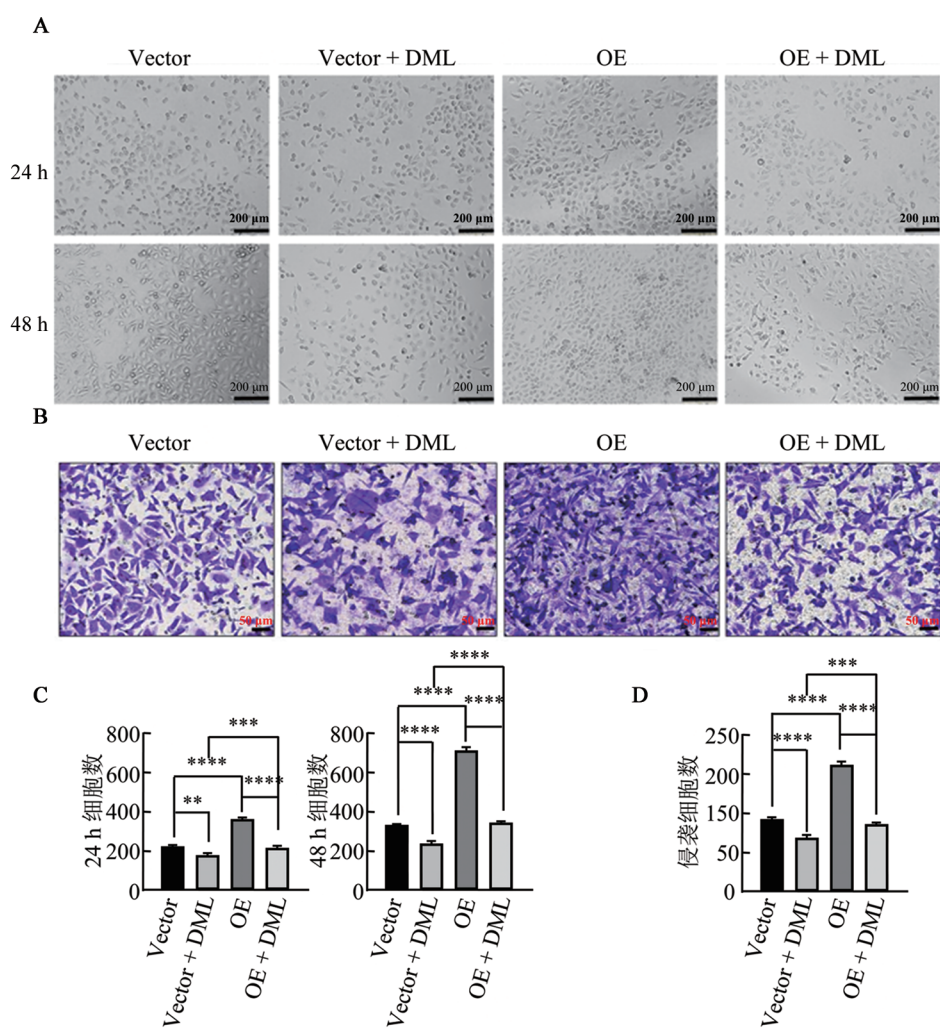
慢病毒转导,构建了 COX17 稳定调控的胃癌细胞模型。功能实验结果显示,敲低 COX17 可显著抑制胃癌细胞增殖和侵袭,而过表达 COX17 则呈现显著的促癌作用,表明 COX17 在胃癌中可能发挥促癌基因的功能,与该基因在头颈癌^[20]中的研究结论一致。

为进一步探索 DML 与 COX17 是否存在直接相互作用,本研究通过分子对接与分子动力学模拟进行了结构层面的预测分析。分子对接结果显示,DML 与 COX17 蛋白的 Lys34、Asp38、His56 等残基之间可能存在疏水接触、氢键和盐桥等相互作用模式,AutoDock Vina 对接评分为 -6.8 kcal/mol,提示二者可能具有一定亲和性。50 ns 分子动力学模拟结果显示,DML-COX17 复合物在模拟条件下具有一定的构象稳定性。综合上述结果,分子对接与分子动力学模拟为 DML 与 COX17 的潜在相互作用提供了结构模拟依据,但尚不能据此认定二者在真实生物体系中发生直接、特异性结合,后续仍需通过表面等离子体共振 (SPR)、等温滴定量热法 (ITC)、细胞热漂移实验 (CETSA) 等实验方法进一步验证。



A:RMSD图;B:RMSF图;C:Rg图;D:SASA图;E:氢键分析图;F:FEL图。

图7 DML-COX17复合物分子动力学模拟分析



A、C:COX17过表达部分减弱DML对MGC-803细胞增殖的抑制作用;B、D:COX17过表达部分减弱DML对MGC-803细胞侵袭的抑制作用。 $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 。

图8 COX17过表达部分减弱DML对MGC-803细胞增殖和侵袭的抑制作用

为明确 COX17 是否参与 DML 对胃癌细胞恶性表型的调控,本研究进一步开展了功能回复实验。结果显示,COX17 过表达可部分逆转 DML 对胃癌细胞增殖与侵袭的抑制效应,提示 COX17 可能参与 DML 对胃癌细胞恶性表型的调控。然而,回复实验仅显示部分逆转效应,因此不宜得出 DML 的抑制作用“依赖于 COX17”或 COX17 是“唯一关键靶点”的结论。DML 作为天然活性小分子,可能通过多靶点协同发挥作用,COX17 可能是其作用靶点之一,DML 可能还存在其他作用靶点或调控途径。

COX17 作为线粒体铜伴侣蛋白,其主要功能是参与线粒体呼吸链复合体 IV 的组装^[13-14]。据此推测,DML 下调 COX17 表达可能导致线粒体呼吸链复合体 IV 活性受损,进而干扰氧化磷酸化功能,影响细胞内 ATP 生成和氧化还原稳态。然而,上述关于线粒体功能的推测目前尚未经实验验证,不属于本研究的直接结论。后续研究可通过检测 DML 处理及 COX17 调控后细胞的线粒体呼吸耗氧率、ATP 水平、活性氧含量、线粒体膜电位及铜离子含量等指标,进一步验证 DML 是否通过 COX17 影响线粒体功能进而发挥抗肿瘤效应。

综上,DML 可抑制 MGC-803 细胞增殖和侵袭并下调 COX17 蛋白表达;COX17 敲低抑制、过表达促进胃癌细胞增殖和侵袭;分子对接与分子动力学模拟为 DML 与 COX17 的潜在相互作用提供了结构模拟依据;回复实验提示 COX17 可能参与 DML 对胃癌细胞恶性表型的调控。以上结果提示 COX17 可能是 DML 发挥抗胃癌作用的相关靶点之一,但仍需通过直接结合实验和体内实验进一步验证。

[参 考 文 献]

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263. DOI:10.3322/caac.21834.
- [2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)胃癌诊疗指南 2025[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2025.
- [3] Wei J T, Bu Z D. Advances in gastric cancer treatment in 2024: Key advancements and emerging trends[J]. *Chin J Cancer Res*, 2024, 36(6): 592-595. DOI:10.21147/j.issn.1000-9604.2024.06.02.
- [4] Li F Q, Cai C Y, Wang F, et al. 20(S)-ginsenoside Rg3 suppresses gastric cancer cell proliferation by inhibiting E2F-DP dimerization[J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156740. DOI: 10.1016/j. phymed. 2025.156740.
- [5] Song Y, Zhao H, Yu R Z, et al. Wogonin suppresses proliferation, invasion and migration in gastric cancer cells via targeting the JAK-STAT3 pathway[J]. *Sci Rep*, 2024, 14: 30803. DOI:10.1038/s41598-024-81196-2.
- [6] 梁爽, 唐源, 兰天, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨雷公藤红素调控铁死亡抑制胃癌的作用机制[J]. *中草药*, 2025, 56(7): 2385-2395. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.015.
- [7] Li Y S, Su Y Y, Zhao Y Z, et al. Demethylzeylasteral inhibits proliferation, migration, and invasion through FBXW7/c-Myc axis in gastric cancer[J]. *MedComm*, 2021, 2(3): 467-480. DOI:10.1002/mco2.73.
- [8] Wang L N, Zhou W, Wang W X, et al. Demethylzeylasteral inhibits oxidative phosphorylation complex biogenesis by targeting LRPPRC in lung cancer[J]. *J Cancer*, 2025, 16(1): 227-240. DOI: 10.7150/jca.92797.
- [9] Zhang Y Y, Huang Y, Yu D P, et al. Demethylzeylasteral induces PD-L1 ubiquitin-proteasome degradation and promotes antitumor immunity via targeting USP22[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(10): 4312-4328. DOI:10.1016/j.apsb.2024.08.004.
- [10] Pan L H, Feng F, Wu J Q, et al. Demethylzeylasteral targets lactate by inhibiting histone lactylation to suppress the tumorigenicity of liver cancer stem cells[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 181: 106270. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106270.
- [11] 廖聪慧. 去甲泽拉木醛抑制胃癌干细胞干性特征的初步研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2023.
- [12] Zhang L, Zhao X L, Cao Z J, et al. Ginsenoside CK inhibits EMT and overcomes oxaliplatin resistance in gastric cancer by targeting the PI3K/Akt pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156516. DOI: 10.1016/j.phymed.2025.156516.
- [13] Horng Y C, Cobine P A, Maxfield A B, et al. Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome c oxidase[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 35334-35340. DOI:10.1074/jbc.m404747200.
- [14] Heaton D N, George G N, Garrison G, et al. The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(3): 743-751. DOI:10.1021/bi002315x.
- [15] Zhu S Y, Zhou W Q, Niu Y Y, et al. COX17 restricts renal fibrosis development by maintaining mitochondrial copper homeostasis and restoring complex IV activity[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(10): 2091-2102. DOI:10.1038/s41401-023-01098-3.
- [16] Zhang B H, Xie L, Liu J H, et al. Construction and validation of a cuproptosis-related prognostic model for glioblastoma[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1082974. DOI:10.3389/fimmu.2023.1082974.
- [17] Jiang T, Wang Z J, Sun Z Y, et al. Single-cell and multi-omics analysis confirmed the signature and potential targets of cuproptosis in colorectal cancer[J]. *J Cancer*, 2025, 16(4): 1264-1280. DOI: 10.7150/jca.104702.
- [18] 沙巴海提·吾斯曼, 伊娜, 刘志琴, 等. 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(12): 1088-1098. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2023.12.008.
- [19] 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]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1123231. DOI:10.3389/fimmu.2023.1123231.
- [20] 卢苇, 江川, 何馨露, 等. 铜代谢相关基因 COX17 与头颈部鳞状细胞癌不良预后相关[J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(5): 688-696. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.05.008.

[收稿日期] 2026-04-20

[修回日期] 2026-07-29

[本文编辑] 苏念