DOI:10.16016/j.1000-5404.202007186

# 双硫仑/铜复合物通过 Drp1 去磷酸化和线粒体转位抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞凋亡

黎 婕,胡金娇,姜秀星,高 宁 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系生药学与中药学教研室

[摘 要] **目的** 研究双硫仑/铜复合物二乙基二硫代氨基甲酸铜[copper(Ⅱ)diethyldithiocarbamate, CuET]对肝癌细胞增殖及凋亡的影响,并探讨其作用机制。**方法** 用不同浓度(0、0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 μmol/L)的 CuET 处理,CuET(2.00 μmol/L)作用不同时间(0、3、6、9、12、24 h)或 Drp1 线粒体转位的选择性抑制剂 Mdivi-1(1.00 μmol/L)预处理肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 后,MTT 实验检测细胞存活率,软琼脂克隆形成实验确定集落形成,流式细胞术分析细胞凋亡,激光共聚焦检测 Drp1 线粒体转位,Western blot 检测细胞凋亡的相关蛋白 cleaved-Caspase 9、cleaved-Caspase 3、cleaved-PARP1、细胞色素 C(cytochrome C, cyto C),以及线粒体分裂蛋白 phospho-Drp1(S637)、phospho-Drp1(S616)和 Drp1 的表达。**结果** CuET 对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞增殖和集落形成的抑制作用呈剂量依赖性($P<0.01$);对 HepG2 和 SMMC-7721 细胞凋亡诱导作用也有明显的剂量和时间依赖性($P<0.01$);Western blot 检测结果显示,CuET 可导致 Caspase 3 和 Caspase 9 的裂解激活,PARP 的降解激活以及 cyto C 从线粒体向细胞质的释放。CuET 处理可导致 Drp1(S637)去磷酸化和 Drp1 线粒体转位。细胞经 Mdivi-1 预处理后可明显阻断 CuET 诱导的 Drp1 线粒体转位、Caspase 3 的裂解/激活、cyto C 的释放以及细胞凋亡。**结论** 双硫仑/铜复合物通过 Drp1 去磷酸化和线粒体转位抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞发生凋亡。

[关键词] 双硫仑;二乙基二硫代氨基甲酸铜;肝癌;细胞凋亡;线粒体动力相关蛋白
[中图法分类号] R735.7; R965.1; R979.19 [文献标志码] A

# Disulfiram/copper complex inhibits proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through dephosphorylation and mitochondrial translocation of Drp1

LI Jie, HU Jinjiao, JIANG Xiuxing, GAO Ning Department of Pharmacognosy and Traditional Chinese Medicine, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of disulfiram/copper complex, copper(Ⅱ)diethyldithiocarbamate (CuET) on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells, and investigate the molecular mechanisms. **Methods** MTT assay was used to detect cell viability in the hepatocellular carcinoma HepG2 and SMMC-7721 cells treated with CuET at the concentrations of 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 or 2 μmol/L for 24 h. Then after the HepG2 and SMMC-7721 cells were treated with 2 μmol/L CuET for 0, 3, 6, 9, 12 or 24 h, MTT assay, soft agar assay and flow cytometry were used to determine cell viability, colony formation and cell apoptosis, respectively. And Western blotting was performed to detect the expression of apoptosis-related proteins, including cleaved-Caspase 9, cleaved-Caspase 3, cleaved-PARP1 and cytochrome C, and mitochondrial mitotic proteins, such as phospho-Drp1 (S637), phospho-Drp1(S616), and dynamin-related protein 1 (Drp1). Laser confocal scanning microscopy was carried out to observe the effect of 1 μmol/L Mdivi-1 pretreatment (a selective inhibitor of Drp1 mitochondrial translocation) for 2 h on the mitochondrial translocation of Drp1. Its effects on the apoptosis and expression

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31571425)
[通信作者] 高 宁,E-mail:gaoning59@163.com

levels of above proteins were also studied. **Results** Compared with the control cells (0 μmol/L), CuET treatment showed inhibitory effects on the proliferation and colony formation, and inductive effect on the apoptosis in HepG2 and SMMC-7721 cells in dose- and time-dependent manners (all $P<0.01$). Western blot assay indicated that CuET treatment led to cleavage/activation of Caspase 3 and Caspase 9, degradation of PARP, as well as release of cytochrome C from the mitochondria into the cytoplasm. CuET treatment also caused dephosphorylation and mitochondrial translocation of Drp1 (S637). Mdivi-1 pretreatment obviously blocked the mitochondrial translocation of Drp1, cleavage/activation of Caspase 3, release of cytochrome C, as well as cell apoptosis induced by CuET treatment. **Conclusion** CuET inhibits the proliferation and promotes apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through dephosphorylation and mitochondrial translocation of Drp1.

[**Key words**] disulfiram; copper(Ⅱ) diethyldithiocarbamate; liver neoplasms; cell apoptosis; dynamin-related protein

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31571425). Corresponding author: GAO Ning, E-mail: gaoning59@163.com

肝癌是全球常见的恶性肿瘤之一,具有恶性程度高、易转移、疾病隐匿、预后差等特点[1]。流行病学研究表明,2018 年世界范围内新增癌症病例中,肝癌占比高达 8.2%,其发病率居世界恶性肿瘤发病率第 6 位,病死率居第 4 位,在男性中更是升至第 2 位,仅次于肺癌,给人类的生命和健康造成了极大的威胁[2]。与此同时,尽管近年来临床上涌现了大量的新型抗癌化疗药物,但靶点不明确引起的毒副作用、药物耐药性依旧是制约持续化疗、降低患者依从性、肿瘤复发转移的主要问题,这也是限制化疗药物成为癌症治疗首选方法的"瓶颈"之一。利用已批准用于治疗多种疾病的药物作为候选抗癌药物是区别于从源头开发新药的一种更快、更便宜的替代方法[3]。这也得益于现有的临床适用给药方案和患者耐受性的证据。

双硫仑(disulfiram,DSF),又名戒酒硫,是美国食品和药物管理局(FDA)批准用于治疗酒精依赖的药物,临床使用超过 60 年,在其推荐剂量下,具有完善的药代动力学、安全性和耐受性等多方面患者数据资料[4-5]。在体内,双硫仑抑制乙醛脱氢酶,阻挠乙醇的正常代谢,致使饮用少量乙醇也可引起乙醛中毒的反应,用药后再饮酒即出现软弱眩晕、嗜睡、全身潮红、头痛、恶心、呕吐、血压下降,甚至休克等反应,令嗜酒者不再思饮酒,而达到戒酒的目的。由于 DSF 在临床前模型中显示出抗癌活性,并且其体内代谢物二硫代氨基甲酸二乙酯(diethyldithiocarbamate, DTC)在临床试验中用做佐剂辅助治疗高危乳腺癌,因而 DSF 成为肿瘤学药物再利用的候选药物[6-10]。尽管 DSF 对多种癌细胞均有不同程度的抑制作用,且 DSF 的抗肿瘤活性依赖 $Cu^{2+}$,即 DSF 的代谢物 DTC 在体内与 $Cu^{2+}$ 形成螯合物二乙基二硫代氨基甲酸铜[copper(Ⅱ) diethyldithiocarbamate, CuET][11],但 DSF 抑制肝癌细胞生长的确切机制仍不清楚。本研究旨在考察不同浓度双硫仑体内活性代谢物 CuET 对肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 增殖及凋亡的影响,并初步探讨其可能的作用机制,以期为双硫仑的"老药新用"提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 均购自美国 ATCC 细胞库;RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶均购自 Gibco 公司;胎牛血清购自天津康源公司;二乙基二硫代氨基甲酸铜(Ⅱ)购自东京化成工业株式会社;Mdivi-1 购自 Selleck 公司;MTT、LC3B、PI 均购自 Sigma 公司;Annexin V-FITC 购自 BD 公司;GAPDH 购自上海碧云天公司;cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9、COXIV、P97 均购自 CST 公司;NPL4、UFD1、cleaved-PARP1 均购自成都正能公司;PARP1 购自 Epitomics 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 用 RPMI 1640 培养基(10%胎牛血清),SMMC-7721 细胞用 DMEM 完全培养基(10%胎牛血清)于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养,待细胞生长至 80%左右,用 0.25%胰蛋白酶消化离心传代。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞活度 处于对数生长期的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞,按 5 000/孔铺 96 孔板,每孔 90 μL 培养基,37 ℃培养过夜后给予不同浓度(0、0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 μmol/L)的 CuET 处理。给药处理后继续培养 24 h,每孔加入 20 μL 0.5% MTT,37 ℃继续培养 4 h,吸尽孔内液体,每孔加入 150 μL DMSO,室温避光振摇约 10 min,溶解甲臜。酶标仪于波长 490 nm 处检测光密度值[$D$(490)]。设既无细胞也不给药的孔为调零孔,设有细胞但不给药的孔为对照孔(其细胞活性为 100%)。所有组平行 3 个复孔。细胞存活率=[处理组 $D$(490)-调零孔 $D$(490)]/[对照组 $D$(490)-调零孔 $D$(490)]×100%。

1.2.3 软琼脂克隆形成实验 用双蒸水配置质量分数为 1.2%的琼脂糖,高压灭菌后置 42 ℃水浴中保持融化状态。将 1 L 装 DMEM 完全培养基粉末(或者 1 L 装 RPMI 1640 培养基粉末)溶于双蒸水中,并定容至 500 mL,0.22 μm 滤膜过滤,即配置 2×DMEM 完全

培养基(或2×RPMI 1640培养基)。取等体积的1.2%的琼脂糖和2×DMEM(或2×RPMI 1640)混匀,每孔1 mL加入12孔板中,室温凝固。HepG2和SMMC-7721组CuET浓度设置均为:0、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 μmol/L。制备单细胞悬液,调整细胞数为1×$10^4$/mL,取1.2%的琼脂糖和2×DMEM(或2×RPMI 1640)按1∶3比例混匀,加入100 μL细胞悬液混匀,取1 mL加入已经凝固的下层胶上。37 ℃、5%$CO_2$培养箱中培养15~20 d,显微镜下拍照,每孔加入100 μL 5%MTT染色,计数比较各组克隆形成情况。每组3个复孔。

1.2.4 细胞凋亡 处于对数生长期的HepG2和SMMC-7721细胞,按1.3×$10^5$/孔接种于6孔板,每孔2 mL培养基,37 ℃培养过夜。实验分组设置为:量效组(0、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 μmol/L)、时效组(0、3、6、9、12、24 h,CuET浓度均为2.00 μmol/L)。量效组给药处理后继续培养24 h收集细胞,时效组给药后不同时间点收集细胞。培养基收集于1.5 mL EP管内,PBS洗涤细胞1次,每孔加入100 μL胰蛋白酶消化细胞,培养基终止消化,收集细胞液于1.5 mL EP管内,1 000 r/min,4 ℃离心5 min。弃上清,按每个样100 μL 1×bingding buffer、2 μL Annexin V-FITC、5 μL PI(50 μg/mL)配置染液,每个样加入100 μL混合染液,斡旋转移液体至1.5 mL EP管内,避光染色15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 Western blot检测 HepG2和SMMC-7721细胞给药处理24 h后,分别提取全细胞蛋白(细胞裂解液,碧云天)、线粒体蛋白和胞质蛋白(线粒体分离提取试剂盒,碧云天)并测定蛋白浓度(BCA蛋白浓度测定试剂盒增强型,碧云天),蛋白液加入loading buffer,96 ℃,金属浴10 min,保存于-80 ℃。经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转3~4 h至PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭30 min,于4 ℃摇床上孵育抗体过夜,TBST洗涤一抗10 min,重复3次,加入二抗于室温下孵育2 h,TBST洗涤后显影。

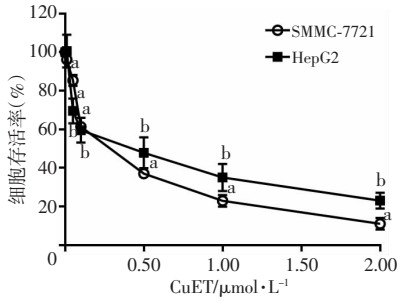
1.3 统计学分析

采用GraphPad 7.0和SPSS 25.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,进行独立样本$t$检验或单因素方差分析。检验水准$\alpha=0.05$。

## 2 结果

2.1 CuET抑制肝癌细胞HepG2和SMMC-7721增殖

结果显示(图1):与对照组相比,随着CuET浓度的增加,肝癌细胞HepG2和SMMC-7721增殖活性逐渐降低,呈现较好的剂量效应。且最大给药组(2.00 μmol/L)处理后,HepG2组细胞存活率仅为23.04%,SMMC-7721组细胞存活率仅为11.02%,与对照组相比差异有统计学意义($P_{HepG2}<0.01$,$P_{SMMC-7721}<0.01$)。CuET对两种肝癌细胞的半数致死浓度($IC_{50}$)分别为$IC_{50(HepG2)}$=(0.315±0.134) μmol/L,$IC_{50(SMMC-7721)}$=(0.219±0.007) μmol/L。其次,在相同药物浓度下,HepG2细胞敏感性强于SMMC-7721细胞,可见CuET对肝癌细胞HepG2和SMMC-7721增殖具有良好的抑制作用。

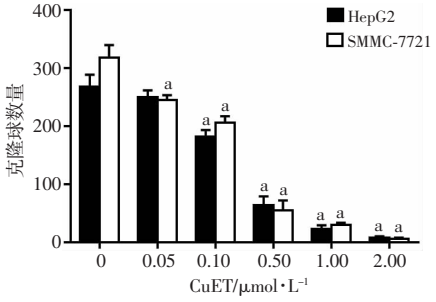



a:$P<0.01$,与SMMC-7721中0 μmol/L CuET组比较;b:$P<0.01$,与HepG2中0 μmol/L CuET组比较

**图1 CuET抑制肝癌细胞HepG2和SMMC-7721增殖**

2.2 CuET抑制HepG2和SMMC-7721细胞克隆球生长

结果显示(图2):相较于对照组,CuET给药处理后,HepG2和SMMC-7721细胞克隆形成数目、克隆球大小均呈现剂量依赖性的减少。且最大给药组(2.00 μmol/L)处理后,与对照组相比,HepG2和SMMC-7721细胞克隆形成数分别减少了97.24%、98.00%($P<0.01$)。实验结果进一步证明了CuET能抑制肝癌细胞HepG2和SMMC-7721的增殖。



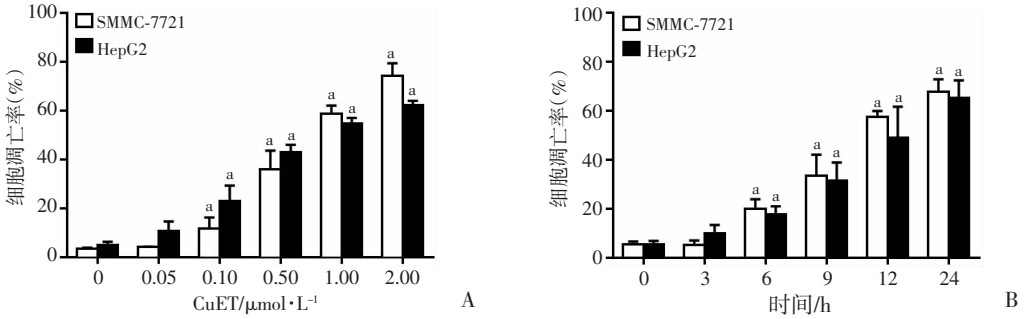

a:$P<0.01$,与对应0 μmol/L CuET比较

**图2 不同浓度CuET对HepG2和SMMC-7721细胞克隆球生长的影响**

2.3 CuET可诱导肝癌细胞HepG2和SMMC-7721发生凋亡

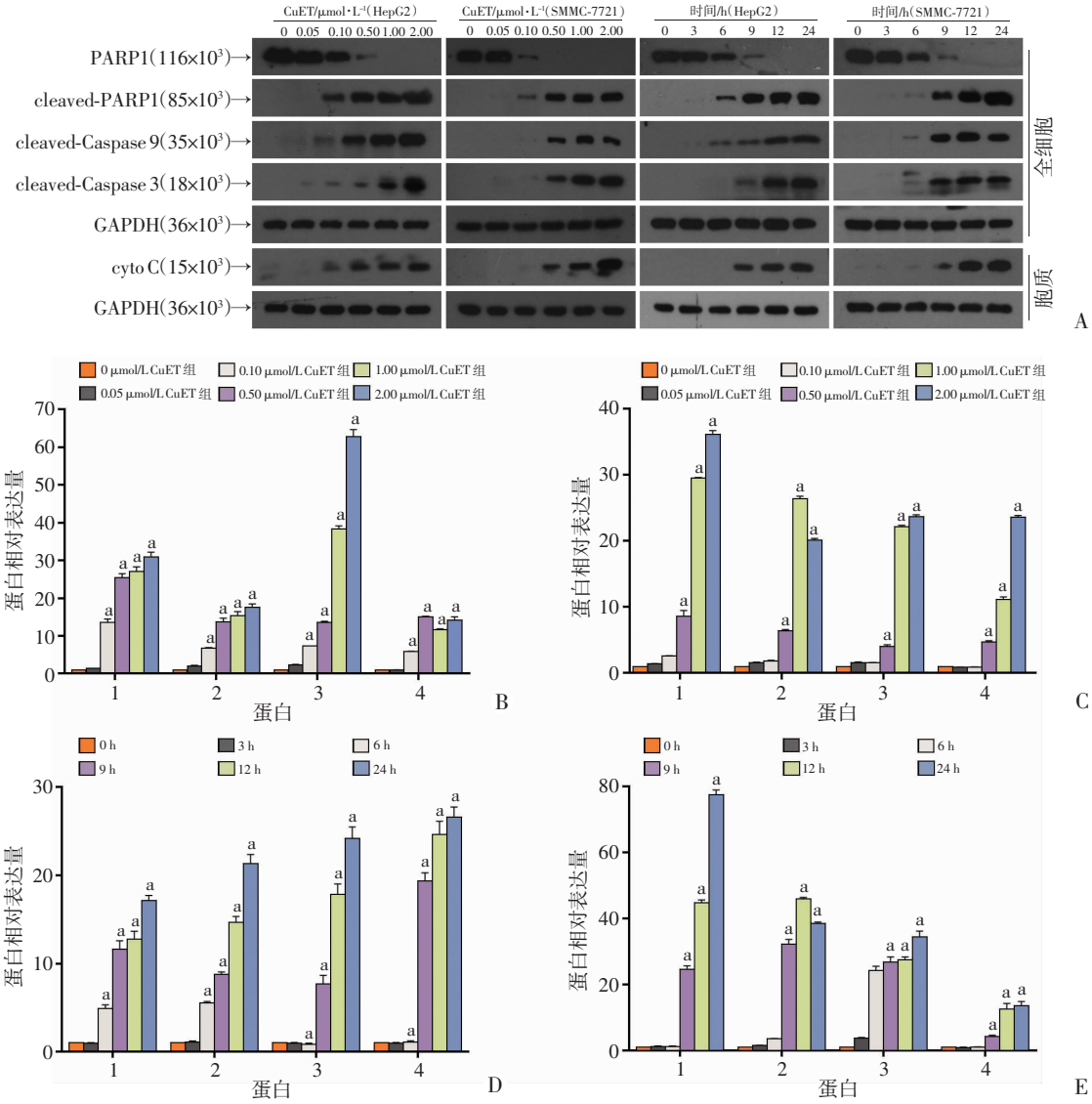
结果显示(图3):相较于对照组,CuET给药处理后,能诱导HepG2和SMMC-7721细胞发生凋亡,呈现一定的剂量和时效依赖性。且最大给药组(2.00 μmol/L)处理后,与对照组相比,HepG2和SMMC-7721细胞凋亡率分别为62.21%、74.22%($P<0.01$)。通过Western blot检测细胞内凋亡相关蛋白表达的变化情况(图4),发现CuET给药处理后,引起PARP1剪切激活,cleaved-PARP1、cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9表达增加以及细胞色素C(cytochrome C,cyto C)释放

至胞质。上述流式及 Western blot 检测结果表明,CuET 激活细胞的凋亡通路,促进肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 发生凋亡。同时,凋亡活性物质细胞色素 C 的释放提示线粒体介导的内源性凋亡通路激活,线粒体可能参与 CuET 诱导肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 凋亡过程。




A:量效组细胞凋亡统计分析;B:时效组细胞凋亡统计分析;a:$P<0.01$,与各自空白对照比较

**图 3　CuET 可诱导肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 发生凋亡**



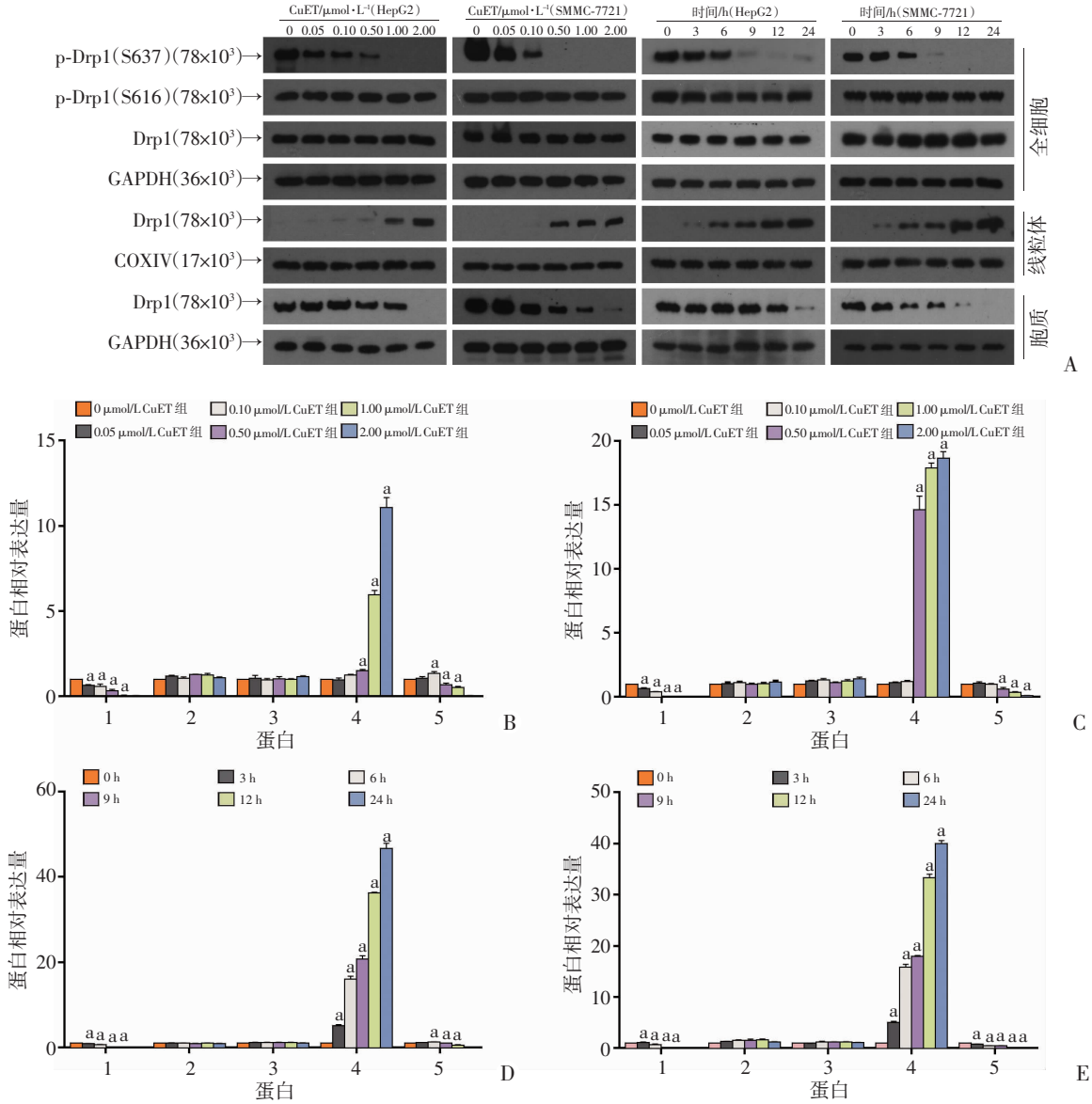

1:cleaved-PARP1;2:cleaved-Caspase 9;3:cleaved-Caspase 3;4:cyto C;a:$P<0.01$,与各自空白对照比较

A:Western blot 检测结果;B:HepG2 量效组 Western blot 半定量分析;C:SMMC-7721 量效组 Western blot 半定量分析;D:HepG2 时效组 Western blot 半定量分析;E:SMMC-7721 时效组 Western blot 半定量分析

**图 4　CuET 对肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 凋亡相关蛋白的影响**

### 2.4　CuET 对线粒体分裂关键蛋白 Drp1 的影响

线粒体的过度分裂会导致线粒体膜通透性增高,进而引起 Caspase 活化的细胞色素 C 等物质释放,启动细胞凋亡的级联反应,最终引起细胞凋亡的发生,因此,过度的线粒体分裂与细胞凋亡之间存在一定的因果关系,而 Drp1(dynamin-related protein 1)是线粒体分裂的关键蛋白。那么,CuET 是否会影响 Drp1 的蛋白修饰和线粒体转位呢?为证实这一猜想,利用 Western blot 检测 Drp1 磷酸化状态的变化和其线粒体转位的变化(图 5),结果可见 CuET 给药处理后可显著减少 Drp1 在 Ser637 位点上的磷酸化,而对 Ser616 位点的磷酸化状态没有显著影响,进一步提取线粒体蛋白及胞质蛋白,Western blot 检测 Drp1 的变化情况,发现 CuET 可使 Drp1 在线粒体上的表达明显增多,在胞质中的表达明显降低,说明 CuET 可使 Drp1 S637 发生去磷酸化及线粒体转位。此外,采用免疫荧光分别染色线粒体和 Drp1 蛋白,激光共聚焦观察发现,正常情况下,Drp1 的蛋白的绿色荧光和线粒体的红色荧光很少共定位,而经 CuET(2 μmol/L,24 h)处理后,可见 Drp1 蛋白的绿色荧光和线粒体的红色荧光出现明显的重叠,呈现黄色荧光共定位(图 6)。由此,进一步证明 CuET 处理后,可使胞质内 Drp1 转位到线粒体上。




1:p-Drp1(S637);2:p-Drp1(S616);3:全细胞 Drp1;4:线粒体 Drp1;5:胞质 Drp1;a:$P<0.01$,与各自空白对照比较

A:Western blot 检测结果;B:HepG2 量效组 Western blot 半定量分析;C:SMMC-7721 量效组 Western blot 半定量分析;D:HepG2 时效组 Western blot 半定量分析;E:SMMC-7721 时效组 Western blot 半定量分析

**图 5　CuET 对线粒体分裂关键蛋白 Drp1 的影响**

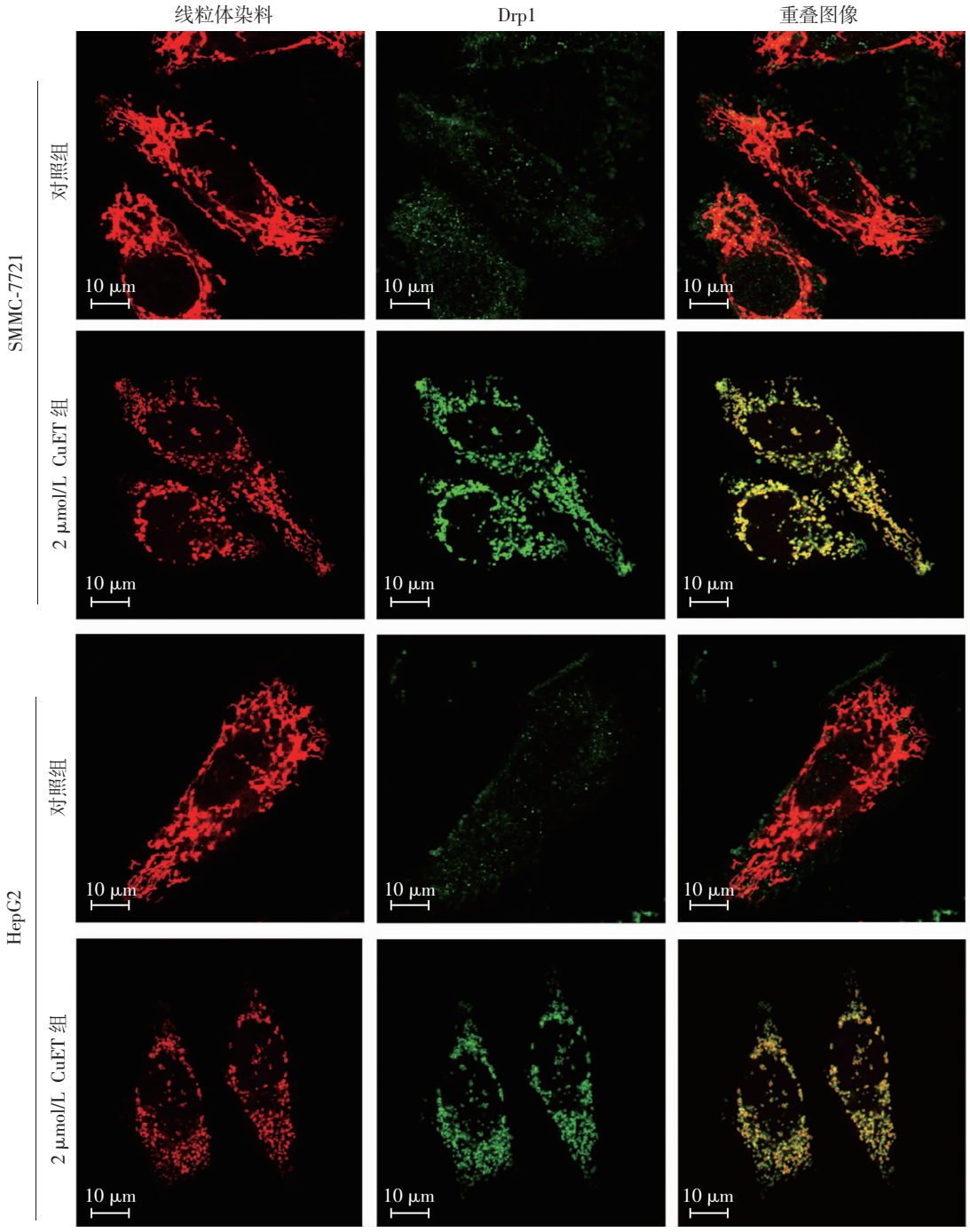
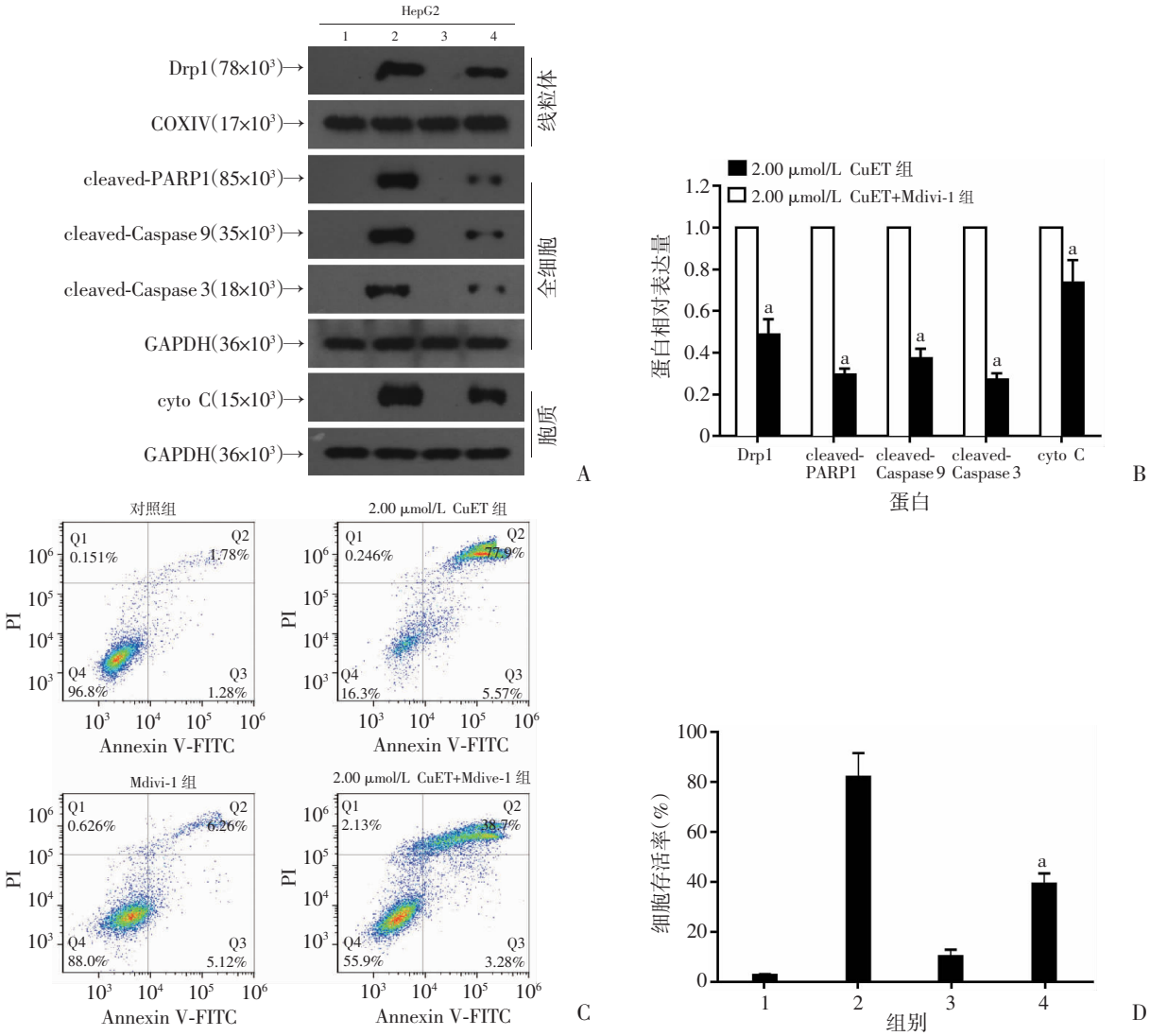



**图 6 激光共聚焦检测 Drp1 线粒体转位**

2.5 CuET 通过影响线粒体分裂关键蛋白 Drp1 的转位促进肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 凋亡的发生

提取线粒体蛋白,Western blot 检测发现,Mdivi-1(1 μmol/L)预处理后,可以明显阻断 CuET 诱导的 Drp1 线粒体转位(图 7A、B)。进一步通过 Annexin V-FITC 和 PI 双染,流式细胞术检测细胞凋亡率发现,细胞经 Mdivi-1 预处理后,可以明显阻断 CuET 诱导的细胞凋亡(图 7C、D)。进一步提取全细胞蛋白、线粒体蛋白和胞质蛋白,Western blot 检测凋亡相关蛋白变化情况。研究结果表明,细胞经 Mdivi-1 预处理后可明显阻断 CuET 诱导的 cleaved-PARP1、cleaved-Caspase 3、cleaved-Caspase 9 表达增加以及细胞色素 C 的释放(图 7A、B)。以上结果说明,CuET 通过使 Drp1 发生线粒体转位,导致线粒体发生过度分裂从而诱导肝癌细胞发生凋亡。




1:对照组;2:2.00 μmol/L CuET 组;3:Mdivi-1 组;4:2.00 μmol/L CuET+Mdivi-1 组;a:$P<0.01$,与 2.00 μmol/L CuET 组比较

A:Western blot 检测结果;B:图 A 中 2、4 组蛋白表达半定量分析;C:抑制 Drp1 线粒体转位对 CuET 诱导的细胞凋亡的影响; D:细胞凋亡统计分析

**图 7 抑制 Drp1 线粒体转位对 CuET 诱导的细胞凋亡的影响**

## 3 讨论

原发性肝癌是目前我国第 4 位常见恶性肿瘤及第 2 位肿瘤致死病因[12]。2015 年流行病学报告显示,我国新增 46.6 万肝癌病例和 42.1 万死亡病例[13],已逐步发展成为威胁国民健康的重大隐患[14-15]。目前,针对不能手术切除和消融的Ⅱb 期、Ⅲ期、Ⅳ期肝癌患者,临床上主要考虑化学药物的系统治疗,代表药物有索拉菲尼、仑伐替尼等,但索拉菲尼在治疗开始后的 2~6 周内,可能出现腹泻、手足综合征、皮疹、心肌缺血以及高血压等不良反应,严重影响药物的疗效及患者用药的依从性[16-17]。

肿瘤细胞异常增殖和凋亡失衡在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用,针对这个环节,对其进行干预性调节成为干预肿瘤发生、发展的重要治疗策略。由线粒体介导的内源性凋亡通路是哺乳动物细胞程序性死亡的主要途径。当细胞受到诸如 DNA 损伤、ATP 耗竭等的凋亡刺激时,可导致线粒体膜肿胀,通透性增高,释放内部的凋亡相关的活性物质,如细胞色素 C、激活下游的 Caspase 家族、激活后的 Caspase 切割特异性底物,最终导致细胞凋亡。线粒体的分裂-融合状态影响这一过程的开展[18-20]。

双硫仑作为经典的治疗酒精依赖的药物,近年来因为在候选抗癌药物大规模筛选中展现出一定的抗癌活性而焕发出新的活力。双硫仑的抗肿瘤活性离不开$Cu^{2+}$的辅助,即与之形成螯合物 CuET。有研究表明,CuET 可诱导肿瘤细胞产生活性氧化物触发氧化应激[21-22],或调节肿瘤细胞内凋亡相关信号通路[23],或者通过改变乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase,ALDH)的活性[24],或抑制泛素-蛋白酶体系统[11],最终导致肿瘤细胞死亡,发挥抗肿瘤作用。此外,DSF 还可通过抑制 P-糖蛋白多药外排泵和抑制 NF-κB 的激活来逆转化疗药物的耐药[25-26]。本研究证明 CuET 能抑制肝癌细胞增殖,显著诱导肝癌细胞凋亡的发生,且导致线粒体内容物细胞色素 C 释放至胞质中,说明由线粒体介导的内源性凋亡通路参与了 CuET 诱导的细胞凋亡过程。

Drp1 是调节细胞线粒体分裂的关键分子,正常情况下 Drp1 蛋白主要以去磷酸化的抑制状态定位于细胞质,在细胞凋亡过程中,Drp1 蛋白可去磷酸化激活,转位至线粒体外膜,缢裂线粒体[27]。Drp1 从胞质转位到线粒体并调控线粒体分裂,与线粒体细胞色素 C 释放和 Caspase 激活密切相关。本研究检测到 Drp1 的 Ser637 位磷酸化水平降低,其线粒体转位增加,说明线粒体途径参与 CuET 诱导的细胞凋亡。

综上所述,双硫仑与铜离子形成的螯合物(CuET)能抑制肝癌细胞增殖并诱导其发生凋亡,其可能的机制为 CuET 减少线粒体分裂关键蛋白 Drp1 在 Ser 637 位点上的磷酸化修饰水平,削弱了其对 Drp1 线粒体转位的抑制作用,从而导致线粒体过度分裂,线粒体膜通透性增高,凋亡活性物质细胞色素 C 释放至胞质中,从而激活下游的 Caspase 家族,进而促进肝癌细胞 HepG2 和 SMMC-7721 凋亡的发生。

**参考文献:**


[1] HIROKAWA F, HAYASHI M, ASAKUMA M, *et al*. Risk factors and patterns of early recurrence after curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma[J]. Surg Oncol, 2016, 25(1): 24-29. DOI:10.1016/j.suronc.2015.12.002.

[2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[3] COLLINS F S. Mining for therapeutic gold[J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10(6): 397. DOI:10.1038/nrd3461.

[4] WRIGHT C, MOORE R D. Disulfiram treatment of alcoholism[J]. Am J Med, 1990, 88(6): 647-655. DOI:10.1016/0002-9343(90)90534-k.

[5] CVEK B. Nonprofit drugs as the salvation of the world's healthcare systems: the case of Antabuse (disulfiram)[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(9/10): 409-412. DOI:10.1016/j.drudis.2011.12.010.

[6] ILJIN K, KETOLA K, VAINIO P, *et al*. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19): 6070-6078. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-09-1035.

[7] CHEN D, CUI Q C, YANG H, *et al*. Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures and xenografts *via* inhibition of the proteasome activity[J]. Cancer Res, 2006, 66(21): 10425-10433. DOI:10.1158/0008-5472.can-06-2126.

[8] ZHA J, CHEN F L, DONG H J, *et al*. Disulfiram targeting lymphoid malignant cell lines *via* ROS-JNK activation as well as Nrf2 and NF-kB pathway inhibition[J]. J Transl Med, 2014, 12(1): 1-9. DOI:10.1186/1479-5876-12-163.

[9] SAFI R, NELSON E R, CHITNENI S K, *et al*. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics[J]. Cancer Res, 2014, 74(20): 5819-5831. DOI:10.1158/0008-5472.can-13-3527.

[10] DUFOUR P, LANG J M, GIRON C, *et al*. Sodium dithiocarb as adjuvant immunotherapy for high risk breast cancer: a randomized study[J]. Biotherapy, 1993, 6(1): 9-12. DOI:10.1007/bf01877380.

[11] SKROTT Z, MISTRIK M, ANDERSEN K K, *et al*. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer *via* p97 segregase adaptor NPL4[J]. Nature, 2017, 552(7684): 194-199. DOI:10.1038/nature25016.

[12] ZHOU M, WANG H, ZENG X, *et al*. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-1158. DOI:10.1016/s0140-6736(19)30427-1.

[13] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.

[14] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, *et al*. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2108. DOI:10.1002/hep.27406.

[15] FU J, WANG H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China[J]. Cancer Lett, 2018, 412: 283-288. DOI:10.1016/j.canlet.2017.10.008.

[16] VOGEL A, CERVANTES A, CHAU I, *et al*. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2018, 29: iv238-iv255. DOI: 10.1093/annonc/mdy308.

[17] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 69(1): 182-236. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.

[18] ESTAQUIER J, ARNOULT D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome C during apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(6): 1086-1094. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402107.

[19] BROOKS C, CHO S G, WANG C Y, *et al*. Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis[J]. Am J Physiol-Cell Physiol, 2011, 300(3): C447-C455. DOI:10.1152/ajpcell.00402.2010.

[20] WAI T, LANGER T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation[J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27(2): 105-117. DOI:10.1016/j.tem.2015.12.001.

[21] 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-κB and Nrf2[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(5): e2797. DOI: 10.1038/cddis.2017.176.

[22] SHAH O'BRIEN P, XI Y, MILLER J R, *et al*. Disulfiram (antabuse) activates ROS-dependent ER stress and apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma[J]. J Clin Med, 2019, 8(5): 611. DOI:10.3390/jcm8050611.

[23] KIM J Y, CHO Y, OH E, *et al*. Disulfiram targets cancer stem-like properties and the HER2/Akt signaling pathway in HER2-positive breast cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 379(1): 39-48. DOI:10.1016/j.canlet.2016.05.026.

[24] CHOI S A, CHOI J W, WANG K C, *et al*. Disulfiram modulates stemness and metabolism of brain tumor initiating cells in atypical teratoid/rhabdoid tumors[J]. Neuro-Oncol, 2015, 17(6): 810-821. DOI:10.1093/neuonc/nou305.

[25] LOO T W. Blockage of drug resistance *in vitro* by disulfiram, a drug used to treat alcoholism[J]. J Natl Cancer Inst, 2000, 92(11): 898-902. DOI: 10.1093/jnci/92.11.898.

[26] SONG W, TANG Z, SHEN N, *et al*. Combining disulfiram and poly(l-glutamic acid)-cisplatin conjugates for combating cisplatin resistance[J]. J Control Release, 2016, 231: 94-102. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.02.039.

[27] KESHAMOUNI V G, MICHAILIDIS G, GRASSO C S, *et al*. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype[J]. J Proteome Res, 2006, 5(5): 1143-1154. DOI:10.1021/pr050455t.

(收稿:2020-07-23;修回:2020-09-21)

(编辑 张 维)