

调节性细胞死亡在脑胶质瘤发生发展、诊断 和治疗中的作用

朱超¹ 张玲叶¹ 丁磊² 黄聪² 雷清春^{1*}

(¹云南省普洱市人民医院神经外科, 普洱 665000; ²云南大学生命科学学院, 昆明 650500)

摘要 脑胶质瘤 (glioblastoma, GBM) 是恶性程度最高的原发性脑肿瘤之一, GBM 增殖速度快、预后差、致死率高, GBM 的临床早期诊断以及治疗缺乏特异的分子标志物。近年来, 越来越多的调节性细胞死亡 (regulated cell death, RCD) 方式, 包括细胞的自噬、凋亡、焦亡、坏死性凋亡以及最近提出的铁死亡和铜死亡得到广泛的研究。RCD 是一个多基因参与多种信号转导途径调控的过程, 细胞死亡对生命体的发育和稳态的维持非常重要, 其失衡往往会诱发肿瘤等疾病, 使其成为促进肿瘤发生发展的推动力。GBM 表达的各种 RCD 相关调控蛋白, 常常异于正常组织, 使这些蛋白在 GBM 的辅助治疗中具有更高的潜力, 这些蛋白为 GBM 的治疗提供了潜在的靶点。该文概述了国内外对 RCD 的研究现状, 并对其在调控 GBM 发生、发展和治疗过程中的作用进行了总结归纳, 阐述了 GBM 中 RCD 的复杂调控机制, 也为临床靶向治疗药物的研发提供了理论参考和指导。

关键词 脑胶质瘤; 调节性细胞死亡; 肿瘤发生发展; 诊断治疗

Roles of Regulated Cell Death in the Occurrence, Development, Diagnosis and Treatment of Glioblastoma

ZHU Chao¹, ZHANG Lingye¹, DING Lei², HUANG Cong², LEI Qingchun^{1*}

(¹Department of Neurosurgery, Pu'er People's Hospital, Pu'er 665000, China;

²School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract GBM (glioblastoma), the most common and aggressive primary brain tumor, is characterized by rapid proliferation, poor prognosis, and high mortality rates. The clinical therapy of GBM faces significant challenges due to the lack of specific molecular markers for early diagnosis and treatment. In recent years, various forms of RCD (regulated cell death) have been increasingly researched, especially, the autophagy, apoptosis, pyroptosis, necroptosis, and the recently investigated ferroptosis and cuproptosis being extensively studied. RCD plays a vital role in the development and homeostasis maintenance of multicellular organisms via precisely regulating the balance between cell death and proliferation. The regulation of RCD is complex and involves multiple genes and signaling pathways. The dysregulation of RCD often leads to pathological changes, including tumorigenesis. Consequently, RCD related genes act as a driving force for tumor initiation, progression, and therapeutic response. Notably, GBM exhibits distinct expression of key regulatory proteins involved in various RCD pathways compared to normal brain tissue. This differential regulation bestows these RCD forms with considerable potential as adjunctive

收稿日期: 2025-08-07 接受日期: 2025-09-30

昆医联合专项-面上项目(批准号: 202501AY070001-201)和国家自然科学基金-地区项目(批准号: 32360165)资助的课题

*通信作者。Tel: 0879-2121852, E-mail: qingchunlei123@163.com

Received: August 7, 2025 Accepted: September 30, 2025

This work was supported by the Kunming Medical University (KMU) Joint Research Program (Grant No.202501AY070001-201) and the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (Grant No.32360165)

*Corresponding author. Tel: +86-879-2121852, E-mail: qingchunlei123@163.com

therapy for GBM, thereby providing novel potential therapeutic targets. This review summarizes current researches on RCD and its roles in regulating GBM pathogenesis and treatment. This paper aims to provide theoretical insights and guidance for understanding the complex regulatory mechanisms of RCD in GBM and researching the clinical targeted drugs for the GBM treatment.

Keywords glioblastoma; regulated cell death; tumorigenesis and progression; diagnosis and treatment

脑胶质瘤(glioblastoma, GBM)是成人中常见的原发性中枢神经系统恶性肿瘤, 约占颅内肿瘤的10.2%, 在神经上皮性肿瘤中的占比则高达22.3%^[1]。GBM源于星形细胞瘤的恶变, GBM具有快速侵袭性生长、微血管增生、坏死以及肿瘤细胞的多形性的特点, 其发病部位常常与周围脑组织无明显界限、肿瘤细胞具有高度间变和不成熟性、新生血管结构不良, 常形成血栓, 伴有退变出血和坏死。位于功能区的肿瘤, 手术很难彻底切除, 易局部播散和复发, 导致GBM的五年生存率不足10%。GBM的治疗包括手术切除肿瘤, 同时结合放射治疗、化学药物治疗等综合手段。近年来, 虽然有一些新的治疗方式如免疫治疗、分子靶向治疗等出现, 但GBM的疗效仍然有限。

GBM的发生涉及多个基因和信号通路的异常, 如TP53和PTEN基因突变、EGFR基因的异常扩增以及PI3K/Akt/mTOR信号通路的异常激活等, 这些改变促进了肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 导致了GBM的恶性表型。2018年, 细胞死亡命名委员会(Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD)对细胞死亡的分类及命名进行了重新定义, 将细胞的死亡方式分为意外性细胞死亡(accidental cell death, ACD)和调节性细胞死亡(regulated cell death, RCD)两大类^[2]。意外性细胞死亡是指细胞在意外或者受到物理、化学或机械刺激等极端的条件下, 细胞结构迅速崩解, 呈现坏死的特征, 该过程不可控, 这些伤害超出了细胞的可调节能力, 而且意外性细胞死亡对各类干扰都不敏感, 呈现一种瞬时性的死亡状态。调节性细胞死亡则是细胞在需要时主动的死亡过程, 这些死亡方式涉及效应分子参与的信号级联反应, 具有独特的分子、形态特征以及免疫学后果。过去认为不同的RCD途径是相互独立的, 但是越来越多的研究发现这些死亡方式之间存在相互串扰。近年来, 研究最为广泛的调节性细胞死亡方式包括自噬(autophagy)、凋亡(apoptosis)、焦亡(pyroptosis)、坏死性凋亡(necroptosis), 也有近几年来提出的铁死亡(ferroptosis)、铜死亡(cuproptosis)等(表1)。单一或者混合的RCD调控失衡将诱导肿瘤等疾

病的发生, 通过药理学或者遗传学等方式对RCD方式进行干预, 成为了肿瘤研究的热点。本文对不同类型的RCD在GBM的发病、诊断以及治疗中的机制进行概述, 以期为GBM的治疗提供新的思路和理论依据。

1 自噬在GBM发生发展、临床诊断和治疗中的作用机制

自噬是指从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分细胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体(autophagosome), 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物, 以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。自噬是受到严格调控的一种多步骤的调节性细胞死亡方式, 其过程主要包括吞噬细胞的起始、囊泡的成核以及延伸扩张、自噬体的形成、自噬体与溶酶体的靶向结合、包裹内容物的降解。与其他细胞器相比, 自噬体并不是长期存在的细胞器, 它的半衰期很短, 是细胞应对环境变化所产生的产物。在正常条件下, 细胞发生自噬的本底水平非常低。但是, 细胞受到外部条件[如营养缺乏、低氧、小分子化合物、激素、活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累、辐射和病原体感染等]的刺激或细胞内部发生变化(如内质网应激、线粒体损伤、过多的细胞质成分积累等)都可以诱导自噬的产生。根据底物进入溶酶体途径的不同, 可将自噬分为微自噬(microautophagy)、分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)和巨自噬(macroautophagy)^[3]。微自噬是指溶酶体膜或内体膜自陷将细胞质蛋白包裹进溶酶体, 并被溶酶体蛋白酶降解的过程。分子伴侣介导的自噬是指含有能帮助溶酶体降解靶蛋白的KFERQ基序的底物蛋白与分子伴侣热休克同源蛋白70(heat shock cognate 70 kDa protein, HSC70)结合后, 将底物蛋白通过溶酶体相关膜蛋白2A(lysosome-associated membrane protein 2A, LAMP2A)转运到溶酶体中并降解。巨自噬在真核生物中高度保守且普遍发生, 在大多数情

表1 细胞自噬、凋亡、焦亡、坏死性凋亡、铁死亡和铜死亡的基本特征

Table 1 Characteristics of autophagy, apoptosis, pyroptosis, necroptosis, ferroptosis and cuproptosis

死亡方式 Death type	形态学特征 Morphological features	生化特征 Biochemical features	诱导因素 Induction factors	调控分子 Regulator molecules	功能 Functions	免疫反应 Immune features	主要抑制剂 Major inhibitors
Autophagy	Autophagic vacuolization plasma membrane blebbing, organelle enlargement	Lysosomal membrane permeabilization, release of lysosomal hydrolytic enzymes	Nutritional deficiency, mTOR inhibition	AMPK, mTOR, ULK1, PI3KIII, Beclin-1, ATGs, LC3	Pro-survival or pro-death	ICD	Chloroquine, bafilomycin A1, concanamycin A, 3-methyladenine, spautin 1, wortmannin
Apoptosis	Cell rounding, nuclear condensation, membrane blebbing, apoptotic body formation, loss of positional organization of organelles	Activation of caspases, DNA fragmentation, $\Delta\Psi_m$ dissipation, phosphatidylserine exposure	DNA damage, activation of death receptors	Death receptors and their ligands, Bax, Bak, Bcl-2, AIF, caspase-3/-8/-9, TP53	Developmental regulation, tumor suppression	TCD or ICD	Z-VAD-FMK, emricasan, Q-VD-OPh, Z-VAD(OH)-FMK, Z-DEVD-FMK, Z-VDVAD-FMK, Q-DEVD-Oph, Ac-DEVD-CHO, ZIETD-FMK, Q-LEHD-Oph
Pyroptosis	Lack of cell swelling, plasma membrane rupture, bubbling, moderate chromatin condensation	Activation of caspase-1/-3, GSDMD, GSDMD cleavage, GSDMD-N-induced pore formation, IL-1 β /-18 release	Pathogen infection, activation of inflammasomes	NLRs, ALRs, caspase-1/-11, GSDMD	Anti-infection, pro-inflammatory	ICD	Ac-YVAD-cmk, Z-YVAD(OMe)-FMK, VX765, wedelolactone, Ac-FLTD-CMK, MCC950, isoliquiritigenin, glybenclamide, CY-09, oridonin
Necroptosis	Cell swelling, rupture of plasma membrane, moderate chromatin condensation	ATP depletion, activation of RIPK1/3 and MLKL	TNF α , Z-DNA binders	Death receptors, TLRs, TCR, RIPKs, MLMK	Inflammatory response, anti-viral infection	ICD	Necrostatin-1, GSK872, HS-1371, necrosulfonamide, tetrahydroisoquinolines, lactoferrin, DNase (NETs degradation)
Ferroptosis	Small mitochondria, reduced number of mitochondrial cristae, elevated mitochondrial membrane density, increased rate of mitochondrial membrane rupture	Iron accumulation, lipid peroxidation, $\Delta\Psi_m$ dissipation, glutaminolysis, caspase-independent	Glutathione depletion, lipid peroxidation	System Xc ⁻ , GPX4, lipid ROS	Tumor suppression, organ damage	ICD	Deferoxamine, ciclopirox, deferiprone, ferrostatin-1, liproxstatin-1, vitamin E, β -carotene, NAC, CoQ10, baicalein, vildagliptin, alogliptin
Cuproptosis	Mitochondrial shrinkage, $\Delta\Psi_m$ dissipation	FDX1-dependent, lipidated protein aggregation	Copper ion overload, mitochondrial respiration inhibition	SLC31A1, ATP7B, FDX1	Potential targets for cancer therapy	ICD	GSH, UK5099, rotenone, antimycin A

ICD: 免疫原性细胞死亡; TCD: 耐受性细胞死亡。

ICD: immunogenic cell death; TCD: tolerogenic cell death.

况下巨自噬就是指通常所说的自噬,也是目前研究的最为详细的一种自噬。我们也将详细描述巨自噬在GBM发生和治疗中的作用机制。

自噬对细胞的存活具有双重作用。在正常细胞中,适度的自噬有利于细胞稳态的维持和氨基酸等营养物质的循环再利用,为细胞的正常生长提供原料。相比于正常细胞,肿瘤细胞的高增殖率以及低氧的不

利微环境,导致肿瘤细胞的代谢能力和各种物质的合成速率提升。自噬在肿瘤细胞中作为一种适应性反应,通过清除受损的大分子或线粒体来保护肿瘤细胞免受应激损伤,免于发生凋亡,促进肿瘤细胞的生存和增殖。但是,过度而持续的应激会导致自噬的持续增强,导致自噬超过一定的限制而使细胞死亡。在正常细胞向肿瘤细胞的转化过程中,自噬可维持基因组

的稳定性以及抑制细胞内有害物质的积累,特别是抑制线粒体等细胞器受损而导致的毒性ROS的过度累积,可防止正常细胞向肿瘤细胞转化。在正常细胞中,自噬基因敲除后,细胞稳态的失衡导致动物自发肿瘤增多^[4]。临床研究发现,抑制自噬能增加化疗药物的抗癌活性,主要是因为化疗药物的治疗干预引起肿瘤的缺氧、缺营养和DNA损伤等压力条件,为使肿瘤细胞应对这样的压力,自噬水平快速上调,为细胞的生长提供营养和能量^[5]。

在GBM临床前研究中,磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/Akt/mTOR信号通路是调控自噬的主要途径,使用雷帕霉素抑制Akt/mTOR的活性可加强自噬,保护由于氧被剥夺而损伤的SH-SY5Y细胞^[6]。但是,Akt的抑制剂在U87细胞中诱导自噬性死亡,并增强细胞对放疗的敏感性^[7]。替莫唑胺(temozolomide, TMZ)是治疗GBM最常见的化疗药物,用100 μmol/L的TMZ处理U373-MG细胞,诱导细胞在3天后发生自噬,从而使细胞增殖受到抑制,但是在第7天后却发现细胞又开始增殖,这说明自噬在这一过程中起到了一定的保护作用^[8]。在放疗过程中,辐射诱发自噬并能使U373-MG细胞G₂/M期阻滞,使用自噬的抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)可以增加U373-MG细胞对辐射的敏感度^[9]。放疗联合化疗诱导U118-MG细胞PI3K/Akt信号通路的抑制和胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)的激活,从而诱发自噬的产生,导致明显的细胞周期阻滞^[10]。在临床转化研究中,I期临床研究显示,mTOR抑制剂Everolimus联合放疗/TMZ在GBM患者中具有较好的治疗耐受性,但是在II期临床实验中,这种联合治疗未能显著延长患者的生存期,尽管显示联合治疗时细胞毒性有所增加^[11]。另外一项I/II期临床研究显示,相对于欧洲癌症研究与治疗组织(European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC)的III期研究结果(18~70岁的生存期为14.6个月),羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)与TMZ联用后复发GBM患者的中位生存期延长至15.6个月(≥18岁)和16.5个月(18~70岁),主要因为HCQ通过抑制自噬体-溶酶体融合,抑制TMZ诱导的保护性自噬^[12]。这些结果显示调控自噬与放化疗联用能显著改善GBM患者的治疗效果。在GBM治疗中,有效地利用自噬调节来提高GBM的治疗效果,以及据此开发新的自噬调节剂,研究自噬调节剂与其他治疗策略的联合使用效果将是

后续GBM治疗研究的重点。

2 凋亡在GBM发生发展、临床诊断和治疗中的作用机制

凋亡的研究历史与自噬同样悠久,凋亡首次由KERR等^[13]在1972年定义。凋亡是一种依赖于能量,由特定的基因或信号通路调控的程序性死亡方式。凋亡发生过程中细胞皱缩、体积缩小、染色质凝集、质膜起泡并伴随细胞核塌陷和细胞碎片被细胞膜包裹形成凋亡小体,随后吞噬细胞将凋亡小体吞噬分解,阻止细胞的内容物释放到周围区域而引起炎症反应。凋亡小体内部可保留完整的细胞器和致密的染色质,不触发溶酶体、线粒体及细胞膜的破裂,没有细胞内容物的外泄。根据凋亡信号的来源不同,可以分为内源性凋亡、外源性凋亡和半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(Caspase)非依赖性细胞凋亡途径。内源性凋亡起始于线粒体,该途径是由细胞内应激(如DNA和线粒体损伤、氧化应激和化疗药物等)引起的,没有死亡受体等胞外因子参与。在内源性凋亡过程中,Bcl-2家族蛋白改变线粒体外膜通透性(mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP),线粒体内外膜通透性的改变导致细胞色素C(cytochrome c, Cyt c)从线粒体膜间隙释放入细胞质并与凋亡蛋白酶激活因子1(apoptotic protease-activating factor 1, APAF1)结合而形成凋亡小体,进而活化下游的Caspase-3/-7蛋白,从而导致细胞程序性死亡^[14]。外源性凋亡途径又称受体依赖性途径,由位于质膜上的死亡受体,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体、Fas(又称CD95或APO-1)受体、TNF相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)受体、DR4(又称TRAIL-R1)和DR5(又称TRAIL-R2、TRICK或KILLER)与其相应的配体结合而启动^[15]。死亡受体通过三聚化与接头蛋白结合招募TNF受体相关死亡结构域蛋白(TNF receptor-associated death domain protein, TRADD)、Fas相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)、TNF受体相关因子2(TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)和Caspase-8等,共同形成死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC),DISC活化下游的Caspase-3/-7蛋白,诱导细胞在短时间内凋亡,而无需线粒体的参与。由此可见,这

两种凋亡途径最后都会激活Caspase-3/-7蛋白,介导不可逆水解底物的级联放大反应而导致细胞凋亡。Caspase非依赖的细胞凋亡信号途径,即内质网途径。其主要依靠内质网腔内Ca²⁺失衡、错误折叠或未折叠蛋白增多而造成内质网的应激反应,启动细胞内凋亡信号,促使细胞凋亡^[16]。

细胞凋亡是细胞周期自带的检查和制衡机制之一,其能及时清除生命体中无功能、有害的、以及不正常的细胞。细胞凋亡的失调与多种疾病发展相关。在健康细胞中,凋亡有助于去除损伤或异常的细胞,防止肿瘤的形成。GBM细胞通过多种机制逃避凋亡,包括过表达抗凋亡蛋白(如Bcl-2、Bcl-xL),抑制促凋亡蛋白(如Bax、Bak)、凋亡启动和执行关键蛋白Caspase的表达,导致“凋亡阈值”升高。检测GBM中凋亡抑制蛋白(如Bcl-2)和促凋亡蛋白(如Bax)表达水平的比率,以及检测肿瘤细胞中的DNA断裂[TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)染色法]可评估肿瘤细胞的凋亡程度^[17]。在GBM中,约30%的GBM存在TP53突变或缺失,导致了DNA损伤后凋亡信号无法被激活,提高了凋亡的耐受程度^[18]。大量的研究致力于揭示细胞凋亡水平的异常在GBM发生发展以及治疗中的作用机制,以及开发以细胞凋亡相关分子为靶点的治疗方法,以提高GBM治疗的特异性和敏感性。

在GBM临床前研究中,GBM细胞中PI3K/Akt/mTOR和Wnt/ β -catenin通路呈激活状态,这些信号通路的激活一方面导致Bcl-2相关死亡促进因子(Bcl-2-associated death promoter, Bad)等蛋白磷酸化,抑制凋亡的发生,另一方面上调细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)等蛋白表达使细胞周期失控,最终促进肿瘤细胞的增殖,介导肿瘤细胞对TMZ的耐药性^[19]。姜黄素可以增加抑癌基因TP53表达水平,降低磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)/mTOR通路相关基因的表达水平,下调Cyclin D1和上调p21的表达而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡^[20]。木犀草素上调促凋亡Bcl-2家族蛋白以及p53和p27的表达,增加TMZ的细胞毒性^[21]。p53功能恢复剂(PRIMA-1Met)能恢复突变型p53的促凋亡功能^[22]。戈米辛J上调Caspase-3的裂解和细胞色素C的表达,从而诱导细胞凋亡^[23]。桑黄酚A促进Caspase-3/-9的活化和切割型聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]的表达,进而诱导细胞凋亡^[24]。

在TMZ耐药GBM中,促凋亡分子Caspase-9活性降低,和厚朴酚和补骨脂异黄酮可提高Caspase-9的活性,协同TMZ诱导耐药细胞凋亡^[25-26]。BH3模拟物(ABT-263)通过特异性结合Bcl-2/Bcl-xL,并抑制其抗凋亡功能,恢复肿瘤细胞的凋亡敏感性^[27]。但是,在GBM的治疗过程中,往往伴随着凋亡抵抗。如MGMT(*O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase)能快速移除*O*⁶-甲基鸟嘌呤,阻断DNA交联与断裂,显著降低TMZ诱导的DNA损伤,减弱凋亡响应^[28]。在GBM缺氧微环境中,激活的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha subunit, HIF-1 α)诱导上调miR-26a的表达,促进抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,介导TMZ的耐药^[29]。在临床转化研究中,小分子烷化剂VAL-083导致MGMT无法识别N⁷甲基化修饰,从而缓解MGMT介导的TMZ耐药,目前有多项临床试验正在评估VAL-083在治疗初发和复发GBM患者中的安全性和有效性^[30]。SAMPSON团队^[31]的II期临床试验结果显示,免疫毒素MDNA55靶向GBM肿瘤微环境中表达白细胞介素-4受体(interleukin-4 receptor, IL-4R)的细胞,激活Caspase级联反应,诱导表达IL-4R的肿瘤细胞凋亡。采用对流增强给药技术(convection-enhanced delivery, CED)后,所有可评估患者($n=44$)中位生存期为11.64个月,12个月总生存率为46%,较历史数据(6~9个月)提升50%以上。由IL-4R高表达和IL-4R低表达患者组成的亚组($n=32$),在接受高剂量MDNA55(>180 μ g)治疗后,获益最佳,患者中位总生存期达15个月,12个月总生存率为55%。基于神经肿瘤学改良疗效评估标准(Modified Response Assessment in Neuro-Oncology, mRANO)标准,该亚组中81%的患者(26/32)实现肿瘤控制,其中包括出现假性进展的患者(15/26)^[31]。综上,靶向恢复凋亡通路,已成为GBM综合治疗的新策略,随着对凋亡机制了解的不断深入,GBM治疗方面的一些难题也有望被突破。

3 焦亡在GBM发生发展、临床诊断和治疗中的作用机制

细胞焦亡是细胞在抵抗外源性感染和对抗内源性稳态丧失时的一种与固有免疫相关的,依赖于Gasdermin蛋白家族的成孔活性的一种细胞裂解性的调节性死亡形式。细胞焦亡的主要特征包括

细胞核碎裂、细胞膜渗透性增高、细胞膜上快速形成微孔。细胞焦亡可导致细胞内容物释放到胞外环境,同时也伴随着炎症因子释放到胞外,诱发局部或者全身性的炎症反应。焦亡最初被认为是由Caspase-1介导的炎症性细胞死亡方式,nod样受体蛋白(nod-like receptor protein, NLRP)和细胞质DNA传感器黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2, AIM2)样受体ALRs(AIM2-like receptors)等蛋白被激活后感知内源性和外源性病理刺激,招募适配器凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC),形成微米级结构的炎症小体,这些寡聚结构活化Caspase-1,诱发Gasdermin蛋白家族成员D(gasdermin D, GSDMD)发生剪切,形成N-端片段(30 kDa)的多聚化,并在细胞膜上形成孔状复合物而诱发细胞内容物的释放,伴随着IL-1 β /-18等大量促炎症因子的释放^[32]。随着研究的深入,研究人员发现,除了Caspase-1介导焦亡外,鼠源的Caspase-11和人源的Caspase-4/-5在不切割炎症因子的情况下通过直接结合细胞内革兰阴性细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)而被激活,引起GSDMD的活化并在细胞膜上形成微孔,伴随着活化的IL-1 β 外释,引发焦亡^[33]。除GSDMD外,Gasdermin蛋白家族中的GSDME也能被Caspase-3/-8和颗粒酶A(granzyme A)所剪切而诱发细胞焦亡^[34]。细胞焦亡与凋亡在细胞形态学改变和发生机制上都有明显区别。细胞发生焦亡时,细胞膜上形成众多1~2 nm的孔隙、细胞肿胀变大,使细胞膜失去调控物质进出的能力,最终导致细胞膜溶解,释放出IL-1 β /-18,释放的IL-1 β /-18募集更多的炎症细胞,扩大炎症反应。细胞凋亡通常伴随着细胞质浓缩、核固缩以及DNA片段化、凋亡小体形成,但是细胞的细胞膜完整,更没有炎症因子的释放。

Gasdermin蛋白家族在肿瘤免疫过程中扮演着重要的作用。有研究指出,GSDME在结直肠癌中的表达受到抑制。此外,GSDME表达的下调与乳腺癌患者的低存活率相关,这些结果显示GSDME诱发的焦亡抑制肿瘤的生长^[35]。其主要是因为GSDME表达增强了肿瘤相关的巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,同时也促进了自然杀伤(natural killer, NK)细胞和杀伤性CD8⁺ T细胞的抗肿瘤作用,诱发了肿瘤细胞发生焦亡,增强了抗肿瘤免疫^[36]。此外,肿瘤微

环境中细胞焦亡诱导的急性炎症增强免疫应答,抑制肿瘤发展。此外,细胞焦亡不仅能抑制肿瘤细胞增殖,还能形成适合肿瘤细胞生长的微环境,促进肿瘤生长。特别是在氧含量较低的肿瘤中心区域,少数肿瘤细胞焦亡引起的慢性肿瘤坏死抑制抗肿瘤免疫,加速肿瘤发展。在GBM患者中,相对于正常组织,肿瘤GSDMD的表达水平随着胶质瘤恶性程度的增加而增加,不同等级的胶质瘤中GSDMD水平升高均与预后呈负相关,抑制GSDMD表达可以抑制GBM细胞的增殖和迁移^[37]。这说明GSDMD是一种新的预测胶质瘤预后的生物标志物,靶向诱导GBM细胞发生细胞焦亡或者促进细胞焦亡进而激活适应性免疫,有望成为GBM治疗的一种新策略。

在GBM临床前研究中,使用炎症小体激活剂或Caspase-1激动剂可促进GBM细胞的焦亡,增强肿瘤对治疗的响应^[38]。EZH2抑制剂DZNep(20 μ mol/L)联合STAT3抑制剂(SH-4-54)可显著升高NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)、GSDMD表达水平,触发细胞焦亡,促进IL-1 β /-18的释放,激活抗肿瘤免疫,使U87 GBM细胞活力显著下降,使实验动物肿瘤体积缩小50%^[39]。在激活适应性免疫方面,焦亡通过释放大量促炎细胞因子(IL-1 β /-18)引发强烈炎症反应,直接裂解肿瘤细胞并诱导免疫细胞浸润,破坏肿瘤微环境的免疫抑制状态,抑制GBM细胞的增殖和迁移。紫檀芪通过STAT3/ROS/CASP3/GSDME通路诱导焦亡,联合PD-1抑制剂显著抑制小鼠原位移植瘤生长,使小鼠生存期延长135%,CD8⁺ T细胞的浸润比例从12.3%提升至28.7%^[40]。肿瘤微环境中的缺氧和酸中毒能通过影响炎症小体的稳定性和活性来调节焦亡。在GBM中,肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)在缺氧微环境中通过ROS上调EZH2表达,维持M2极化,减少CD8⁺ T细胞浸润,而GBM细胞焦亡缺失导致IL-1 β /-18等炎症因子释放不足,加剧肿瘤细胞的免疫逃逸^[41]。肿瘤相关巨噬细胞通过NLRP3炎症小体激活焦亡,释放IL-1 β ,间接促进GBM的血管生成和侵袭^[42]。在临床前的转化研究中,研究人员使用减毒鼠伤寒沙门氏菌(VNP20009)构建免疫刺激型,使用沙门氏菌纳米胶囊输送系统(irritable anthrax salmonella nanocapsule delivery system, IASNDS)精准追踪并攻击手术减容后残余的GBM细胞,诱导肿瘤细胞焦亡并招募CD8⁺ T细胞,启动先天性与适应性免疫反应,使免疫细胞浸润增

强,在雄性小鼠模型中显著抑制GBM术后复发^[43]。也有研究团队开发了一种能响应肿瘤酸性微环境释放的芦荟大黄素(aloe-emodin, AE)的生物矿化纳米载体, AE-NPs(AE@ZIF-8 NPs), 增强了其血脑屏障穿透能力和肿瘤靶向性。AE-NPs显著提高了AE颅内分布水平和肿瘤组织蓄积量,有效促进GBM细胞焦亡。体内实验显示, AE-NPs处理组小鼠肿瘤体积显著缩小,生存期显著延长^[44]。这些结果为焦亡诱导剂的临床转化提供了范例,也为后续对其进行临床前安全性评估提供了重要的前期基础。

4 坏死性凋亡在GBM发生发展、临床诊断和治疗中的作用机制

坏死性凋亡与凋亡、自噬被视为程序性细胞死亡的经典范式之一。1998年LASTER等^[45]在TNF α 刺激、泛Caspase抑制剂Z-VAD-FMK存在时观察到“肿胀性细胞死亡”的现象。随后DEGTEREV等^[46]于2005年将其正式命名为Necroptosis, 并发现特异性抑制剂Nec-1(necrostatin-1)。坏死性凋亡是正常的凋亡途径被抑制时发生的一种替代性的、不依赖于Caspase蛋白的、同细胞坏死有相似形态学特点的死亡方式。与凋亡的“细胞皱缩-膜完整性保持”不同,坏死性凋亡早期即出现线粒体膜电位丧失、胞质空泡化、质膜通透性骤增,晚期细胞体积迅速膨胀,质膜破裂并释放高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、IL-33等损伤相关分子,进而触发无菌性炎症级联放大。坏死性凋亡细胞可同时保留部分细胞器结构,核染色质仅轻度凝集,不形成凋亡小体。它既规避了Caspase级联机制,也绕开了溶酶体膜破裂,所释放内容物迅速激活邻近巨噬细胞与树突状细胞,形成免疫热点微环境。凋亡和坏死性凋亡的作用机制有着高度的相似性,两者均使用相同的上游TNF分子信号,坏死性凋亡是在凋亡受抑制时的一条备途径以确保RCD的实现。坏死性凋亡依赖于受体相互作用蛋白激酶1/3(receptor-interacting protein kinase 1 and 3, RIPK1/3)的磷酸化,并激活混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase like protein, MLKL), MLKL被激活后寡聚化并转位至细胞膜,破坏膜完整性;细胞释放非感染性内源性损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)分子(如HMGB1、ATP等)、炎

症细胞因子和趋化因子等到胞外,从而诱发体内的炎症反应^[47]。DAMPs分子还参与获得性免疫的抗原呈递细胞的识别,通过激活CD8⁺ T细胞以增强肿瘤监测。其中RIPK1在诱导细胞程序性坏死方面起着决定性作用,也在TNF-NF- κ B信号通路中起着至关重要的作用, RIPK3则是诱导细胞在凋亡和坏死性凋亡之间转换的关键。坏死性凋亡主要包括死亡受体途径、Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)途径、干扰素途径和细胞内模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)途径。在死亡受体途径中,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF α)及其受体肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)结合后形成复合物,激活NF- κ B通路,促进肿瘤细胞的生存。在Caspase-8活性被抑制的条件下, RIPK1与RIPK3等形成坏死小体,激活RIPK3^[46]。在TLR途径中, TLR3和TLR4通过其TIR结构域诱导干扰素- β 适配器蛋白(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF)与RIPK1或RIPK3相互作用,激活RIPK3^[48]。在干扰素途径中, I和II型干扰素通过JAK-STAT通路上调RIPK3的表达,或激活蛋白激酶R(protein kinase R, PKR)及诱导Z-DNA结合蛋白1(Z-DNA-binding protein 1, ZBP1)表达,敏化细胞,直接/间接激活坏死性凋亡^[49]。PRR途径通过ZBP1识别细胞质内异常核酸后直接招募RIPK3,激活坏死性凋亡^[50]。这些途径最终都通过RIPK3-MLKL核心通路,导致细胞膜破裂和溶解性死亡,具体选择哪条途径取决于刺激类型、细胞类型及细胞内环境。

坏死性凋亡在肿瘤的发生发展中也具有双重作用。一方面,肿瘤细胞发生坏死性凋亡伴随着DAMPs分子的释放,促进炎症发生,导致周围正常组织被破坏,这种持续而慢性的炎症微环境刺激新生血管的形成,减弱肿瘤的适应性免疫反应,促进肿瘤细胞的增殖和转移。炎症反应也使NF- κ B或MAPK信号通路被激活,这些通路的激活促进肿瘤细胞的侵袭和转移。另一方面, DAMPs的释放触发炎症反应,促进树突状细胞的抗原呈递,增强CD8⁺ T细胞的肿瘤杀伤效应,引起固有免疫和适应性免疫杀伤肿瘤细胞,进而抑制肿瘤细胞的生长。大部分的研究显示坏死性凋亡在对抗肿瘤中具有积极的作用。肿瘤微环境和坏死性凋亡的细胞之间存在相互作用,肿瘤微环境促进或者抑制肿瘤细胞的增殖、迁移等的总体效应还需要深入研究。

在GBM临床前研究中, 研究发现GBM患者血清HMGB1水平显著升高, 并与肿瘤体积及复发风险呈正相关, 外泌体产生的HMGB1蛋白对肿瘤复发风险的检测更具特异性^[51], 这些蛋白具备无创监测GBM的潜力。*RIPK3*启动子高甲基化或*MLKL*错义突变在间充质亚型GBM中高发, 导致坏死性凋亡阈值升高, 使得肿瘤细胞在遭受DNA损伤、缺氧或代谢应激时能够逃避坏死性细胞凋亡, 维持肿瘤干细胞的干性并促进侵袭性生长^[52]。此外, GBM坏死区酸性微环境(pH6.4~pH6.8)可激活酸敏感离子通道1a(acid-sensing ion channel 1a, ASIC1a)蛋白, 触发Ca²⁺内流并招募RIPK1, 激活不依赖TNF α 的“代谢-坏死”通路, 这提示微环境本身也可成为坏死性凋亡的启动器^[53], 通过碳酸氢钠碱化微环境(pH7.2)可以阻断该通路^[54]。在GBM的治疗中, RIPK1激动剂necrostatin-1衍生物(necrostatin-1 stable, Nec-1s)经脂质体包裹后可有效穿越血脑屏障, 在表皮生长因子受体III型变体(epidermal growth factor receptor variant III, EGFRvIII)突变的GBM小鼠模型中, 单药治疗使中位生存期延长至41天, Nec-1s经脂质体包裹后与TMZ联用可使中位生存期延长至58天^[55]。脂质体递送MLKL磷酸化模拟肽可在体外诱导GBM细胞快速死亡, 且对正常星形胶质细胞无明显毒性^[56]。对于接受颅脑放疗的患者, 坏死性凋亡介导的旁效应可致认知损伤, RIPK1抑制剂GSK963或MLKL抑制剂GW806742X通过阻断坏死性凋亡减轻神经炎症并保护海马神经元^[57]。在GBM的临床前转化研究中, 高RIPK1表达与GBM患者较低生存率显著相关, 单独使用RIPK1抑制剂GSK2982772, 或者RIPK1抑制剂与顺铂联用, 显著诱导了肿瘤细胞的坏死性凋亡, 大大降低了U251肿瘤细胞的增殖能力^[58]。RIPK3激动剂N⁶-异戊烯基腺苷(N⁶-isopentenyladenosine, iPA)处理U87细胞和GBM原代细胞后, RIPK1/3和MLKL的活化及坏死小体的形成均显著增强, 而Caspase-3/-8和PARP在GBM细胞中未被激活, 说明坏死性凋亡被诱导, 且不影响非癌性脑细胞系的活力。其主要是因为iPA通过结合RIPK3的 α -螺旋B, 诱导其构象变化, 进而激活下游的坏死性凋亡信号通路, 导致MLKL磷酸化, 最终诱导了胶质瘤干细胞(glioma stem cell, GSC)的死亡, 从而显著抑制了其自我更新^[59]。这些结果显示, iPA治疗克服了胶质母细胞瘤的凋亡抵抗, 也为开发更具血脑屏障穿透性的靶向RIPK3的小分子药物提供了新的理论依据, 为实现精准治疗开辟了新途径。

5 铁死亡在GBM发生发展、临床诊断和治疗中的作用机制

铁死亡这一概念是2012年提出的, 是一种由细胞内微环境的扰动引起的氧化性、非凋亡的调节性细胞死亡方式。铁死亡依赖于铁代谢产生的ROS和脂质过氧化物的积累所产生的致死毒性, 导致细胞死亡。铁死亡发生时没有细胞凋亡的显著标志, 不需要Caspase蛋白参与, 凋亡抑制剂(Z-VAD-FMK)和坏死性凋亡抑制剂(necrostatin-1)对铁死亡的抑制无效。在细胞铁死亡的过程中, 无细胞体积缩小、染色质凝集及线粒体肿胀等特征, 而且在细胞凋亡受到抑制时, 铁死亡依然能够发生。铁死亡细胞在形态上主要表现为细胞变小变圆且相互分离、细胞没有核固缩、细胞膜不破裂但质膜起泡、线粒体皱缩、嵴减少或消失、膜密度增加及外膜破裂、细胞核大小正常但染色质不凝聚。铁死亡在氨基酸、脂质过氧化以及铁代谢过程中具有重要作用, 同时铁死亡也受到这些物质代谢的调节。在正常的生理条件下, 人体内的铁主要以三价铁的形式与转铁蛋白结合, 少量的二价铁主要与铁蛋白结合, 避免细胞发生氧化损伤。但是, 外界刺激可以诱导含铁化合物释放二价铁, 并通过Fenton反应氧化细胞内的脂类等有机物, 形成脂质ROS, 脂质ROS持续累积导致细胞膜上的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)被ROS氧化形成脂质过氧化产物(lipid peroxide, LPO), 诱导细胞膜破裂, 导致细胞死亡。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是细胞中最重要的小分子抗氧化剂之一。在正常的生理条件下, 细胞通过胱氨酸/谷氨酸反向转运体[cystine and glutamate transport system, system Xc⁻, 由溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)和溶质载体家族3成员2(solute carrier family 3 member 2, SLC3A2)组成的异二聚体]从胞外摄入胱氨酸并使其被还原为半胱氨酸, 同时以1:1的比例排出谷氨酸, 以维持胱氨酸和谷氨酸的平衡。GSH可在谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的作用下转化为氧化型谷胱甘肽(glutathione disulfide/oxidized glutathione, GSSG), 还原ROS和活性氮(reactive nitrogen species, RNS), 从而减轻氧化应激损伤。GPX4是GSH抗氧化体系的核心调控酶, 其抑制脂氧合酶(lipoxygenases, LOXs)的活性, 清除因二价铁的累积而产生的脂质过氧化物, 减轻细胞膜的损伤^[60]。若细胞外的谷氨酸

浓度过高,或System Xc⁻受到抑制时,胱氨酸的吸收减少,机体的GSH合成减少,导致脂质过氧化物堆积而促使铁死亡的发生。若细胞内GSH缺失,GPX4活性降低,脂质过氧化物不能被GPX4催化的还原反应所代谢,且Fe²⁺以类似Fenton反应的方式氧化脂质,使ROS聚集,则会加剧铁死亡。此外,铁的摄入、排出、储存和流量都会影响铁死亡,该过程受铁反应元件结合蛋白2(iron-responsive element binding protein 2, IREB2)调节,沉默IREB2会减少铁死亡。对细胞内脂质过氧化、铁含量以及GPX4活性的测定可用于铁死亡分析。

铁死亡在肿瘤的发生发展以及治疗中同样表现出双重作用。细胞的增殖容易受到巯基代谢的影响,含巯基的半胱氨酸和GSH等物质的代谢紊乱导致细胞内ROS水平升高,细胞死亡增加,通过抗氧化处理能抑制ROS的增加。铁过载导致的氧化应激具有一定的致癌作用。相对于正常细胞,肿瘤细胞的代谢更加旺盛,ROS的负载水平更高,对铁的需求量更大,因此,肿瘤细胞对铁死亡更加的敏感。肿瘤细胞也会利用额外的机制,如对肿瘤免疫微环境的影响,来对抗ROS水平升高引起的铁死亡,降低其对铁死亡的敏感性。此外,铁死亡可导致慢性炎症的发生,为了帮助邻近的肿瘤细胞生存或者逃避炎症引起的免疫反应,发生铁死亡的肿瘤细胞与肿瘤浸润性免疫细胞相互作用后,肿瘤细胞会产生前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)等免疫抑制物,引起抗肿瘤免疫的抑制,促进肿瘤生长。因此,铁死亡作为一种与细胞凋亡具有不同机制的调节性细胞死亡方式,为GBM的治疗提供了更多的可能性,干预肿瘤细胞对铁的吸收和代谢而触发肿瘤细胞的铁死亡可能是一种有效的治疗肿瘤的方法。

在GBM的临床前研究中,GBM组织中呈现“高铜高铁”特征,铜通过上调SLC31A1与下调ATP酶铜转运 α/β 多肽(ATPase copper transporting alpha/beta polypeptide, ATP7A/B)而促进铜流入,铜催化Fenton反应,提高ROS的水平,与此同时,细胞内的铁代谢也发生重编程,表现为铁转运蛋白(transferrin receptor, TFR)与铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)的表达水平升高,形成“铁过载”微环境^[61]。GBM细胞通过表观遗传重编程(如EZH2高表达)和代谢重编程(SAM代谢增强)抑制

线粒体硫辛酰化,规避铁死亡,促进肿瘤发生^[62]。在GBM中, System Xc⁻-GSH-GPX4轴被显著抑制, SLC7A11低表达、GPX4高甲基化,导致GSH合成不足、脂质过氧化物累积受限,使细胞避免铁死亡^[63]。GBM组织中铁死亡相关基因簇表达显著下调,其中GPX4、SLC7A11高表达,花生四烯酸脂氧合酶表皮3(arachidonate lipoyxygenase epidermal 3, ALOXE3)低表达,导致GBM组织中脂质ROS清除能力增强,抑制铁死亡^[64]。C5aR1/METTL3介导m⁶A修饰稳定GPX4的mRNA表达,阻断铁死亡,加速GBM发展^[65]。此外,GBM中常见的致癌突变(如TP53缺失)通过抑制SLC7A11的表达,增强GBM细胞对铁死亡的易感性^[66]。GPX4抑制剂(如RSL3)或System Xc⁻抑制剂(如Erastin)可诱导GBM细胞铁死亡,并在体内外实验中显示出抗肿瘤效果^[67]。铁螯合剂(如去铁胺)可通过降低细胞内铁水平抑制肿瘤生长。铁过载剂(如柠檬酸铁铵)则可能增加不稳定铁水平、促进脂质过氧化和铁死亡,以增强铁过载剂对GBM的疗效^[68]。天然小分子Erianin通过REST/LRSAM1促进SLC40A1泛素降解,降低铁外排蛋白水平,诱导GSC铁死亡并逆转TMZ耐药^[69]。在GBM的临床前转化研究中,研究人员发现System Xc⁻抑制剂柳氮磺吡啶(sulfasalazine, SAS)能显著降低GBM细胞对胱氨酸的摄取和GSH水平,同时增加ROS的水平。SAS与放疗协同促进了DNA双链断裂,并促进了胶质瘤细胞死亡。在体内实验中, SAS与伽玛刀放射(gamma knife radiosurgery, GKRS)联合治疗显著延长了小鼠生存期^[70]。SAS单一治疗或者SAS与放疗联合治疗GBM,已经在临床前有相关研究。在GBM的免疫疗法中,细胞毒性T细胞(cytotoxic T cells, CTLs)释放的干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)可激活下游JAK-STAT1信号通路,下调胱氨酸/谷氨酸反向转运体System Xc⁻的表达,从而减少细胞内GSH的合成,增加游离铁水平,最终诱导GBM细胞发生铁死亡^[71]。纳米酶钴掺杂的磁赤铁矿纳米颗粒(cobalt-doped maghemite iron oxide nanoparticles, Cox-MION)可模拟过氧化物酶的纳米复合物,一方面通过类酶活性直接生成脂质过氧化物,另一方面凭借其球形结构机械性抑制肿瘤生长,在临床前模型中实现了约40%的肿瘤体积缩减^[72]。这些结果都显示出了铁死亡在GBM治疗中的潜力,为GBM的临床治疗提供了很好的参考。

6 铜死亡在GBM发生发展、临床诊断和治疗中的作用机制

铜死亡(cuprotosis)是由铜离子(Cu^+)在线粒体中过度积累,导致线粒体呼吸过程三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中的脂酰化蛋白异常寡聚,脂酰化蛋白丧失活性而导致线粒体呼吸受损的一种细胞死亡方式。这是一种不同于凋亡、焦亡、坏死、自噬和铁死亡的新的细胞死亡方式。细胞凋亡的抑制剂(Z-VAD-FMK和BOC-D-FMK)、铁死亡抑制剂ferrostatin-1、坏死抑制剂necrostatin-1以及氧化应激抑制剂N-acetyl cysteine对铜离子载体诱导的细胞死亡均没有显著影响。但是依赖于线粒体呼吸的细胞在铜离子作用下产生的细胞毒性是依赖于糖酵解细胞的1 000倍。用铜离子载体伊利司莫(elesclomol, ES)处理细胞后, TCA循环的相关代谢产物失调,这些结果提示铜离子调节线粒体呼吸而诱导细胞的死亡。在胞质中, Cu^+ 与 Cu^{2+} 同时存在, Cu^+ 作为一种还原性辅酶因子,若在细胞中浓度过高,也会像铁离子一样通过Fenton反应产生ROS, ROS促使线粒体应激损伤,促进线粒体自噬发生。此外, Cu^+ 干扰了TCA循环和电子传递链(electron transport chain, ETC),导致过量的铜离子与线粒体TCA循环中的硫辛酰化蛋白结合,导致这些蛋白的聚集和铁硫簇蛋白丢失,引发蛋白质毒性应激,导致细胞死亡。铜死亡依赖于铁氧还蛋白1(ferredoxin 1, FDX1)与硫辛酸合成酶(lipoic acid synthase, LIAS)。FDX1将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ ,并促进丙酮酸脱氢酶与 α -酮戊二酸的脂酰化,放大铜离子的毒性。 Cu^+ 和FDX1直接与LIAS结合,促进二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT)发生硫辛酰化,促进铜死亡的发生^[73]。LIAS与FDX1结合后,利用Fe-S簇帮助蛋白完成脂酰化修饰,是铜死亡的帮凶。在这个过程中,由于丙酮酸转化乙酰CoA被阻断, TCA循环被抑制,造成了严重的线粒体功能障碍,使细胞中毒死亡。也有研究认为, FDX1并未直接参与Fe-S簇蛋白合成,铁氧还蛋白2(ferredoxin 2, FDX2)才是线粒体Fe-S簇蛋白合成中的电子供体, FDX1只参与LIAS依赖的硫辛酰化过程^[74]。铜离子的存在也有可能使细胞发生自噬、促进铁死亡等,因此,对铜死亡发生时细胞的形态特征的界定并不特别明确。其主要表现为线粒体收缩、细胞膜破裂、内质网损伤以及染色质损坏等。铜死亡发生过程中,由于TCA循环被抑制,细胞内的生化指标会发生非常大

的变化,包括铜离子、丙酮酸和 α -酮戊二酸的积累,琥珀酰CoA含量的下降。对氧化应激的检测,可以从不同角度了解铜死亡过程中细胞内的氧化还原状态、抗氧化防御能力以及细胞损伤程度。

和铁离子一样,铜作为酶的辅助因子,正常细胞中铜离子通过主动稳态机制保持在较低的水平。癌细胞内与增殖、呼吸相关的代谢酶具有比正常细胞更强的活性,铜离子作为一种与代谢息息相关的辅酶因子,在癌组织中具有更高的浓度。GBM组织中铜离子浓度是正常脑组织的2~3倍^[75],铜离子通过激活HIF-1 α 信号通路,增强肿瘤缺氧适应能力^[76],这可能与肿瘤血管异常增生导致的铜积累有关。在肿瘤细胞中,通过铜损耗或铜过载导致铜稳态的失衡,使肿瘤细胞的血管生成受到抑制、蛋白酶活性受到抑制、线粒体功能受损, ROS水平升高,因此,靶向肿瘤细胞铜代谢通路的关键基因可以作为抗肿瘤治疗的新靶点。目前针对铜稳态治疗的抗肿瘤作用机制主要有两种,一种是采用铜络合剂结合铜离子并降低其含量,抑制肿瘤细胞的增殖和转移;另一种是通过铜离子载体将铜离子输送至细胞内,或者采用铜死亡诱导剂,以增加细胞内 Cu^{2+} 水平并干扰铁硫簇蛋白生物合成,产生ROS,诱导肿瘤细胞死亡。此外,采用铜基纳米材料将铜离子递送至肿瘤细胞内,在肿瘤的治疗中也受到广泛的关注。

在GBM临床前研究中,GBM细胞通过上调铜转运蛋白ATP7A和金属硫蛋白的表达,建立了铜耐受机制,这可能是GBM治疗产生耐药性的原因之一^[77]。生物信息学分析发现11个铜死亡相关基因(cuprotosis-related genes, CRGs,如SLC31A1、FDX1、DLST、LIPT1、LIPT2、DLD、NFE2L2、ATP7A、DLAT、GCSH和ATP7B)在GBM组织和非肿瘤组织之间的表达存在差异,这些基因可以作为患者预后和评估免疫治疗疗效的生物标志物,特别是SLC31A1高表达与胶质瘤细胞恶性程度增加相关,能促进肿瘤细胞增殖和迁移^[78]。也有研究者在209例GBM样品中筛选出79个预后相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),利用这些基因进一步构建了包含PDI44、DUSP6、PTPRN、PILRB和CBLN1的预后风险评估模型。研究发现,低风险组的GBM患者具有更高的肿瘤突变负荷,但其总生存期(overall survival, OS)较长。风险评估结果与药物敏感性相关,且与肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)指数呈负相关^[79]。还有研究

者通过富集分析和微环境分析发现,铜死亡活性评分(cuproptosis activity score, CuAS)与肿瘤免疫浸润显著相关,鉴定出5条关键信号通路(如ICAM1、ITGAX、ITGB2通路)和8个配体-受体对(如ANXA1-FRR1),并筛选出13种靶向高CuAS胶质瘤的潜在治疗药物,包括寡霉素A、双氢青蒿素等^[80],这些结果提示铜死亡缺陷可加速GBM进展,铜离子的增加可能促进GBM细胞的死亡。ES联合Cu²⁺可特异性诱导GBM细胞铜死亡,并增强其对TMZ的敏感性^[81]。铜离子能够促进肿瘤细胞表面程序性细胞死亡配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)表达,这有利于靶向PD-L1的抗癌药物定位,更高的铜离子浓度能促进PD-L1泛素化降解,促进肿瘤抗原特异性CD8⁺T细胞和NK细胞的激活和增殖^[82]。GUO等^[83]设计了一种ROS敏感性两亲性可生物降解聚合物(PHPM),然后用PHPM将ES和Cu封装形成纳米颗粒NP@ESCu。NP@ESCu在进入癌细胞后,能够被癌细胞内过量的活性氧触发并释放出ES和铜,二者协同作用,通过铜死亡途径杀伤癌细胞,同时还会诱导免疫应答。进一步的研究发现, NP@ESCu可与PD-L1抗体(anti-programmed cell death ligand 1 antibody, α PD-L1)联合使用增强 α PD-L1的免疫治疗效果^[83]。在GBM中,采用HFn-Cu-REGO纳米颗粒(重链铁蛋白-铜-瑞戈非尼共递系统),HFn(重链铁蛋白)通过转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1, TfR1)实现向GBM的靶向递送,瑞戈非尼通过阻断自噬过程诱导细胞死亡,铜离子(Cu²⁺)不仅能提高药物的包封效率,还可激活铜死亡,从而协同增强瑞戈非尼对GBM的治疗效果^[84]。对SLC31A1高表达的患者,可以设计铜载纳米药物进行治疗,因为GBM细胞明显比正常细胞更容易吸收此类药物。使用铜螯合剂,如四硫钼酸盐通过抑制赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX),可减少血管生成与转移,为异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)野生型GBM治疗提供新策略^[85]。这些结果都显示通过靶向铜死亡相关基因治疗GBM具有良好的潜力,为GBM的治疗提供理论参考。

7 挑战与展望

细胞死亡是原核和真核细胞中的一种保守现象。RCD受特定信号转导途径控制,这为通过遗传信号或药物干预调控RCD提供了契机。RCD过程中不同的致死程序会影响癌症的进展,以及对治疗的反应性。癌细胞可获得破坏RCD通路的突变使其具有对

抗癌治疗的特性,因此,逃避RCD是癌细胞的重要特征之一。调控多个RCD信号通路的关键节点基因,可以避免癌细胞对某一特定类型RCD的耐药性,从而达到治疗目的。因此,关注不同RCD通路之间的关系、串扰可能是未来癌症治疗研究的一个新方向。

尽管这些RCD根据其启动基因、效应基因、执行基因以及形态学方面的变化进行定义,但是随着研究的深入,新发现的细胞死亡方式很难整合进该体系,而且现有的分类未能充分体现分子通路在识别细胞死亡形式中的重要性。现在的分类体系也未能充分反映不同细胞死亡形式之间潜在的相互作用与交叉对话,因为细胞死亡过程是由复杂相互作用网络介导的,这一网络参与的细胞死亡过程可能无法在分类体系中完全体现。由于同一信号分子的多效性,一个特异的刺激往往会引起多种细胞死亡方式,导致这些RCD途径之间存在相互的交流串扰。如凋亡、自噬和焦亡等都需要Caspase家族成员的参与,但是激活各自途径的具体成员又有明显的差异,Caspase-3/-7在凋亡中发挥着重要的作用,而Caspase-1在焦亡的过程中起着决定性的作用。在其他的RCD中,Caspase可能或多或少的参与其中,但是都没有起到决定性的作用,而像铁死亡的触发,都不需要Caspase家族蛋白的参与。坏死性凋亡作为一种受调控的坏死形式,与坏死和凋亡具有相似性。RIPK1以激酶依赖性方式激活凋亡和坏死性凋亡,并作为衔接蛋白介导由RIPK3构象变化启动的凋亡。线粒体损伤释放的细胞色素c激活细胞凋亡,细胞凋亡常常导致线粒体ETC被破坏而产生ROS,ROS又会促进细胞的铁死亡。常用化疗药物处理可诱导Caspase-9介导凋亡,也可以激活GSDME而启动焦亡^[86]。自噬对于自噬性死亡和自噬依赖性细胞死亡程序均不可或缺。近期研究表明,自噬与铁死亡通路以复杂方式相互作用:自噬通过清除受损线粒体和过氧化脂质来调控铁死亡,但过度或持续的自噬会导致铁蛋白降解,进而诱发铁死亡^[87]。内膜分选转运复合体III(endosomal sorting complexes required for transport-III, ESCRT-III)作为一种膜运输系统,参与膜重塑和剪切过程,并通过促进MLKL、GSDMD孔洞和过氧化脂质损伤的质膜的脱落与修复,来调控多种细胞死亡方式,从而延缓细胞死亡进程^[88]。不同的RCD之间在特定的环境下可以相互转化。如自噬过程中的Caspase作用并不明显,其主要是通过PI3K-mTORC1信号通路以及Beclin-1和Bcl-2等因子共同调

节发生的,但自噬却能促进或抑制凋亡的发生,在特定环境下直接转化为凋亡。采用Caspase抑制剂抑制凋亡后,坏死性凋亡通路被激活。这种后备系统也可能在其他细胞死亡方式被阻滞时激活。

同一个细胞或者细胞器在不同的刺激条件下也能同时激活多种RCD。线粒体在多种RCD(包括凋亡、铁死亡和铜死亡等)中发挥关键作用。溶酶体在细胞死亡(包括自噬和凋亡等)中也扮演多重角色。在溶酶体介导的细胞死亡中,溶酶体膜透化导致组织蛋白酶释放,激活凋亡通路。在自噬性死亡中,溶酶体与自噬体融合降解细胞组分,引起细胞死亡。溶酶体胞吐作用与焦亡的诱导有关。在线粒体中,凋亡由线粒体外膜透化触发,导致细胞色素c释放并激活Caspase级联反应。在凋亡过程中,由于线粒体的破坏,细胞的ROS释放增加。释放的ROS通过多种方式触发细胞死亡,如引起脂质过氧化导致铁死亡。铁死亡过程中 Fe^{2+} 催化脂质氢过氧化物(lipid hydroperoxide, L-OOH)产生ROS,ROS反过来氧化铁硫蛋白簇组装因子LIAS和铁硫簇组装蛋白2(iron-sulfur cluster assembly 2, ISCA2),导致铁硫蛋白丢失,进一步促进 Fe^{2+} 释放,引起蛋白质脂酰化缺陷,促进铜死亡^[89]。由此可见,ROS在多种细胞RCD中起着重要的作用,其可以作为凋亡等细胞死亡方式的结果,也可以作为铁死亡等细胞死亡方式的原因。此外,ROS与调控这些死亡方式的关键蛋白之间,可能还存在负反馈环的相互作用关系。

不同类型RCD之间的相互关联也可能通过多种信号通路进行调控,从分子机制水平来看,细胞最终的死亡方式主要由信号通路的活化、诱导因子的释放以及相关蛋白的表达等因素决定。细胞凋亡、坏死性凋亡和焦亡在传统意义上被认为是相互独立的RCD。近年来研究发现,这三种细胞死亡形式可在同一个细胞内同时被激活,这三种途径之间存在广泛的机制重叠。基于此,研究人员提出了泛凋亡(PANoptosis)的概念,PANoptosis由“PANoptosome”蛋白质复合物触发,该复合物由RIPK1、RIPK3、Caspase-8、NLRP3和ASC等多种蛋白组装而成,该复合物能够同时激活焦亡、凋亡和坏死性凋亡,引发炎症性细胞死亡,但是不能单独用这三种RCD中的任何一种对死亡方式进行解释,这三种死亡方式通过泛凋亡进行分子串扰^[90]。ZBP1对这三种途径的激活都至关重要,ZBP1通过识别甲型流感病毒(influenza A virus,

IAV)核糖核蛋白并与RIPK3、RIPK1、NLRP3、Caspase-1/-8/-6相互作用,诱导ZBP1依赖性PANoptosome的形成。PANoptosome参与NLRP3炎症小体的激活导致依赖于GSDMD的焦亡。Caspase-1或-8的激活会切割并激活下游效应蛋白(如GSDMD和RIPK3),分别诱导焦亡和坏死性凋亡。当焦亡被阻断时,Caspase-8活化可切割Caspase-3诱发细胞的凋亡,Caspase-8失活会诱发MLKL介导的坏死性凋亡^[91]。泛凋亡为细胞死亡提供了一种替补机制,即当一个或多个程序性细胞死亡通路被病原体或其他阻断物破坏时,泛凋亡可以作为细胞死亡的“备份程序”,替代本应该被激活的程序性细胞死亡。

我们也看到,很多种类的RCD对肿瘤的作用并非简单的抑制或者促进的作用。其对肿瘤增殖的影响更多的依赖于肿瘤所处的发展阶段与免疫微环境。例如,一方面,自噬可能通过过度降解细胞内容物导致细胞的死亡,从而成为细胞程序性细胞死亡的执行者。另一方面,自噬的本职工作是维持细胞的稳态,自噬通过对死亡通路上蛋白的特异性降解,实现对蛋白质、细胞器等质与量的控制,实现管理职能。自噬对坏死也存在对凋亡类似的控制。无论是凋亡还是坏死,自噬对它们抑制的最终目标都是为了维持细胞生存。然而,一旦无法维持,自噬必须促进异常细胞以合理的方式死亡,以利于局部稳态。所以自噬既是RCD的执行者,也是管理者。因此,自噬既可以抑制凋亡也可以促进凋亡。此外,利用RCD治疗肿瘤也需要注意其潜在的副作用,特别是对正常细胞的毒性。研究发现,RCD的激活剂除了导致肿瘤细胞的损伤外,同样也能导致正常细胞的损伤。如铜离子等金属离子的过度积累将导致正常细胞和肿瘤细胞的损伤,特别是对于一些用做药物载体的金属(如金),其在细胞内的积累是否也会引起正常细胞的损伤还需要重点的关注。考虑到GBM肿瘤细胞的异质性,GBM的发展阶段、肿瘤组织中不同类型的细胞以及GBM细胞所处的免疫微环境都将对不同RCD的诱导剂产生不一样的效果,这都需要对药物种类、剂量和副作用等机制进一步的探索。因此,一方面,我们需要在各种疾病模型甚至细胞类型中确定药物导致细胞毒性的精确浓度范围,然后建立合理的个性化治疗策略。目前,我们仍然迫切需要开发能够标示各种RCD的特异生物标志物,特别是可以在患者体液或者活检标本中就能检测到的生物标志物。另一方面,寻找

存在于肿瘤细胞中能被特定受体识别的靶基因,完善其临床前研究,控制毒副作用,这将为利用RCD治疗GBM提供更多的参考和理论依据。

8 结论

GBM是人类最具威胁的癌症之一,GBM化疗药物单一,易产生耐药性,放疗容易对人体产生危害,靶向治疗的优势在癌症治疗中不断地凸显出来,不仅仅是它能够针对性地治疗癌症,更因为它对人体伤害更小。对于靶向药物治疗,最重要的一点就是有对应的可用于抑制或者消除癌细胞的靶点。肿瘤细胞需要无限增殖,因此,它们往往通过抵抗死亡克服生长抑制和逃避免疫细胞的杀伤。细胞的死亡可以维持正常的代谢和体内平衡,其失衡往往诱发肿瘤等疾病,使其成为促进肿瘤发生发展的推动力。如在肿瘤的中心区域,往往存在低氧的环境和葡萄糖的剥夺,细胞往往会发生坏死性细胞死亡,然而这种死亡往往重塑了肿瘤微环境,反而使其成为促进肿瘤发展的诱因。随着越来越多的细胞死亡方式及其分子机制被阐明,人们对RCD在GBM中的作用的认知也在不断的更新。然而,随着研究的深入,该领域研究正变得愈发具有挑战性。尤其是不同RCD进程通过分子机制相互关联,有时甚至可能被共同激活。这种关联性使得用于区分不同细胞死亡类型的分子标志物特异性日趋模糊。开发能够激活或者抑制不同RCD通路关键节点上的启动蛋白或者效应蛋白的新型药物,对预防或者治疗GBM具有巨大的前景。但是,目前所研究的化合物除了在药代动力学和药效学方面存在潜在问题外,人体内负责调控程序性细胞死亡的信号模块之间错综复杂的相互关联性仍是一个值得关注的问题。因此,尽管在特定条件下促进细胞死亡看似相对简单,但一旦越过先前未明确的阈值,抑制细胞死亡便变得颇具挑战性。这可能需要同时抑制多个信号转导模块,而实现这一目标难度较大。因此,现有抑制剂是否具备足够特异性始终是关注的焦点。开发特异性更高的新型抑制剂或调控关键基因或许可解决抑制剂特异性不足的问题。然而,复杂细胞死亡形式的出现表明,仅抑制单一死亡类型可能难以实现治疗效果。因此,未来细胞死亡研究需从整合不同死亡类型的视角,也需阐明不同细胞死亡信号通路间的互动,鉴定每种RCD类型特有的分子效应器、评估抗RCD的促生

存或重编程机制、界定各RCD子程序的“不可逆临界点”、探究RCD过度或不足在人类疾病中的角色。

参考文献 (References)

- [1] LEI Q, GU H, LI L, et al. TNIP1-mediated TNF-alpha/NF-kappaB signalling cascade sustains glioma cell proliferation [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 530-8.
- [2] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [3] KE D, XU H, HAN J, et al. Curcumin suppresses RANKL-induced osteoclast precursor autophagy in osteoclastogenesis by inhibiting RANK signaling and downstream JNK-BCL2-Beclin1 pathway [J]. *Biomed J*, 2024, 47(1): 100605.
- [4] LIPPAI M, SZATMARI Z. Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2017, 33(2): 145-68.
- [5] KUMA A, HATANO M, MATSUI M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period [J]. *Nature*, 2004, 432(7020): 1032-6.
- [6] 卢娜,魏林郁,王宝英,等.雷帕霉素减轻氧糖剥夺对SH-SY5Y细胞的损伤[J].*中国病理生理杂志*(LU N, WEI L Y, WANG B Y, et al. Rapamycin attenuates oxygen-glucose deprivation-induced damage in SH-SY5Y cells [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2017, 33(1): 104-9.
- [7] LEFRANC F, FACCHINI V, KISS R. Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas [J]. *Oncologist*, 2007, 12(12): 1395-403.
- [8] KANZAWA T, GERMANO I M, KOMATA T, et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 448-57.
- [9] ITO H, DAIDO S, KANZAWA T, et al. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(5): 1401-10.
- [10] CHIU H W, HO S Y, GUO H R, et al. Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances autophagic effects in U118-MG cells through increased mitotic arrest and regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Autophagy*, 2009, 5(4): 472-83.
- [11] ESCAMILLA-RAMIREZ A, CASTILLO-RODRIGUEZ R A, ZAVALA-VEGA S, et al. Autophagy as a potential therapy for malignant glioma [J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(7): 156.
- [12] ROSENFELD M R, YE X, SUPKO J G, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme [J]. *Autophagy*, 2014, 10(8): 1359-68.
- [13] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-57.
- [14] ITO T, DENG X, CARR B, et al. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(18): 11671-3.
- [15] HENGARTNER M O. Apoptosis: corraling the corpses [J]. *Cell*, 2001, 104(3): 325-8.
- [16] NAKAGAWA T, YUAN J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(4): 887-94.
- [17] MCDONALD F E, IRONSIDE J W, GREGOR A, et al. The prognostic influence of bcl-2 in malignant glioma [J]. *Br J Cancer*, 2002,

- 86(12): 1899-904.
- [18] CHIPUK J E, MOLDOVEANU T, LLAMBI F, et al. The BCL-2 family reunion [J]. *Mol Cell*, 2010, 37(3): 299-310.
- [19] MANNING B D, CANTLEY L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1261-74.
- [20] KIM T J, KIM H J, KANG M, et al. Ginsenoside F2 induces cellular toxicity to glioblastoma through the impairment of mitochondrial function [J]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153483.
- [21] NAVONE S E, GUARNACCIA L, RIZZARO M D, et al. Role of luteolin as potential new therapeutic option for patients with glioblastoma through regulation of sphingolipid rheostat [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 130.
- [22] BYKOV V J, ISSAEVA N, SHILOV A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound [J]. *Nat Med*, 2002, 8(3): 282-8.
- [23] LI R, YANG W. Gomisin J inhibits the glioma progression by inducing apoptosis and reducing HKII-regulated glycolysis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(1): 15-22.
- [24] LIAO K F, CHIU T L, CHANG S F, et al. Hispolon induces apoptosis, suppresses migration and invasion of glioblastoma cells and inhibits GBM xenograft tumor growth *in vivo* [J]. *Molecules*, 2021, 26(15): 4497.
- [25] WU G J, YANG S T, CHEN R M. Major contribution of Caspase-9 to honokiol-induced apoptotic insults to human drug-resistant glioblastoma cells [J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1450.
- [26] MASZCZYK M, BANACH K, KARKOSZKA M, et al. Chemosensitization of U-87 MG glioblastoma cells by neobavaisoflavone towards doxorubicin and etoposide [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5621.
- [27] LESSENE G, CZABOTAR P E, SLEEBES B E, et al. Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(6): 390-7.
- [28] HEGI M E, DISERENS A C, GORLIA T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 997-1003.
- [29] GE X, PAN M H, WANG L, et al. Hypoxia-mediated mitochondria apoptosis inhibition induces temozolomide treatment resistance through miR-26a/Bad/Bax axis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1128.
- [30] GOLEBIEWSKA A, HAU A C, OUDIN A, et al. Patient-derived organoids and orthotopic xenografts of primary and recurrent gliomas represent relevant patient avatars for precision oncology [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(6): 919-49.
- [31] SAMPSON J H, SINGH ACHROL A, AGHI M K, et al. Targeting the IL4 receptor with MDNA55 in patients with recurrent glioblastoma: results of a phase IIb trial [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25(6): 1085-97.
- [32] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-5.
- [33] KAYAGAKI N, STOWE I B, LEE B L, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 666-71.
- [34] SARHAN J, LIU B C, MUENDLEIN H I, et al. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(46): E10888-E97.
- [35] XIA X, WANG X, CHENG Z, et al. The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-"host" [J]? *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 650.
- [36] ZHANG Z, ZHANG Y, XIA S, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2020, 579(7799): 415-20.
- [37] 蒲亚陆. GSDMD基因高表达同胶质瘤预后关系的研究[D]. 新乡: 新乡医学院, 2022.
- [38] DAI Z, LIU W C, CHEN X Y, et al. Gasdermin D-mediated pyroptosis: mechanisms, diseases, and inhibitors [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1178662.
- [39] YU D, WANG S, WANG J, et al. EZH2-STAT3 signaling pathway regulates GSDMD-mediated pyroptosis in glioblastoma [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1): 341.
- [40] CHEN Z, FANG X G, JIA L J, et al. Pterostilbene as a pyroptosis inducer and tumor microenvironment regulator inhibits glioblastoma and enhances the efficacy of immunotherapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 163: 115247.
- [41] GUO X, XUE H, SHAO Q, et al. Hypoxia promotes glioma-associated macrophage infiltration via periostin and subsequent M2 polarization by upregulating TGF-beta and M-CSFR [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(49): 80521-42.
- [42] GE Z, DING S. The crosstalk between tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor cells and the corresponding targeted therapy [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 590941.
- [43] ZHANG Y, XI K, FU Z, et al. Stimulation of tumoricidal immunity via bacteriotherapy inhibits glioblastoma relapse [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4241.
- [44] FANG X, CHEN Z, ZHOU W, et al. Boosting glioblastoma therapy with targeted pyroptosis induction [J]. *Small*, 2023, 19(30): e2207604.
- [45] LASTER S M, WOOD J G, GOODING L R. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis [J]. *J Immunol*, 1988, 141(8): 2629-34.
- [46] DEGTEREV A, HUANG Z, BOYCE M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112-9.
- [47] MENG Y, GARNISH S E, DAVIES K A, et al. Phosphorylation-dependent pseudokinase domain dimerization drives full-length MLKL oligomerization [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6804.
- [48] KAISER W J, SRIDHARAN H, HUANG C, et al. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(43): 31268-79.
- [49] THAPA R J, NOGUSA S, CHEN P, et al. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(33): E3109-18.
- [50] IMAI T, LIN J, KAYA G G, et al. The RIPK1 death domain restrains ZBP1- and TRIF-mediated cell death and inflammation [J]. *Immunity*, 2024, 57(7): 1497-513.e6.
- [51] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-80.
- [52] SEIFERT L, WERBA G, TIWARI S, et al. The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression [J]. *Nature*, 2016, 532(7598): 245-9.
- [53] LIU X, ZHANG Z, RUAN J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-8.
- [54] OFENGEIM D, MAZZITELLI S, ITO Y, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(41): E8788-E97.
- [55] WU J, HUANG Z, REN J, et al. Mkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mkl in necroptosis [J]. *Cell Res*, 2013, 23(8):

- 994-1006.
- [56] HUANG Z, WU S Q, LIANG Y, et al. RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 17(2): 229-42.
- [57] OFENGEIM D, MAZZITELLI S, ITO Y, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(41): E8788-E97.
- [58] AMOROS MORALES L C, GOMEZ BERGNA S M, MARCHE-SINI A, et al. RIPK1 in diffuse glioma pathology: from prognosis marker to potential therapeutic target [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(12): 5555.
- [59] PAGANO C, NAVARRA G, COPPOLA L, et al. N6-isopentenyladenosine induces cell death through necroptosis in human glioblastoma cells [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 173.
- [60] BUCCARELLI M, D'ALESSANDRIS Q G, MATARRESE P, et al. Elesclomol-induced increase of mitochondrial reactive oxygen species impairs glioblastoma stem-like cell survival and tumor growth [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 228.
- [61] TOYOKUNI S, ITO F, YAMASHITA K, et al. Iron and thiol redox signaling in cancer: an exquisite balance to escape ferroptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 610-26.
- [62] MATESANZ-SANCHEZ R, PEITZSCH M, LANGE I, et al. A novel role of exostosin glycosyltransferase 2 (EXT2) in glioblastoma cell metabolism, radiosensitivity and ferroptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2025, 32(9): 1664-78.
- [63] MASHAYEKHI S, MAJEDI H, DEHPOUR A R, et al. Ferroptosis as a therapeutic target in glioblastoma: mechanisms and emerging strategies [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025, 36(3): 102649.
- [64] YANG X, LIU J, WANG C, et al. miR-18a promotes glioblastoma development by down-regulating ALOXE3-mediated ferroptotic and anti-migration activities [J]. *Oncogenesis*, 2021, 10(2): 15.
- [65] JIANG Y, ZHAO J, LI R, et al. CircLRFN5 inhibits the progression of glioblastoma via PRRX2/GCH1 mediated ferroptosis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 307.
- [66] JIANG L, KON N, LI T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.
- [67] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-31.
- [68] TORTI S V, TORTI F M. Iron and cancer: more ore to be mined [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(5): 342-55.
- [69] MANSUER M, ZHOU L, WANG C, et al. Erianiin induces ferroptosis in GSCs via REST/LRSAM1 mediated SLC40A1 ubiquitination to overcome TMZ resistance [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(7): 522.
- [70] SLEIRE L, SKEIE B S, NETLAND I A, et al. Drug repurposing: sulfasalazine sensitizes gliomas to gamma knife radiosurgery by blocking cystine uptake through system Xc⁻, leading to glutathione depletion [J]. *Oncogene*, 2015, 34(49): 5951-9.
- [71] BOTTCHER J P, BONAVITA E, CHAKRAVARTY P, et al. NK cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control [J]. *Cell*, 2018, 172(5): 1022-37, e14.
- [72] CARVALHO S M, MANSUR A A P, DA SILVEIRA I B, et al. Nanozymes with peroxidase-like activity for ferroptosis-driven biocatalytic nanotherapeutics of glioblastoma cancer: 2D and 3D spheroids models [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(6): 1702.
- [73] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-61.
- [74] SCHULZ V, BASU S, FREIBERT S A, et al. Functional spectrum and specificity of mitochondrial ferredoxins FDX1 and FDX2 [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(2): 206-17.
- [75] CHEN L, MIN J, WANG F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 378.
- [76] BUCCARELLI M, D'ALESSANDRIS Q G, MATARRESE P, et al. Elesclomol-induced increase of mitochondrial reactive oxygen species impairs glioblastoma stem-like cell survival and tumor growth [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 228.
- [77] GUERTIN DA, WELLEN K E. Acetyl-CoA metabolism in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(3): 156-72.
- [78] WANG Y, QIAO S, WANG P, et al. Copper's new role in cancer: how cuproptosis-related genes could revolutionize glioma treatment [J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 859.
- [79] ZHANG B, XIE L, LIU J, et al. Construction and validation of a cuproptosis-related prognostic model for glioblastoma [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1082974.
- [80] CHEN B, ZHOU X, YANG L, et al. A cuproptosis activation scoring model predicts neoplasm-immunity interactions and personalized treatments in glioma [J]. *Comput Biol Med*, 2022, 148: 105924.
- [81] WU A, YIN N, LI Z, et al. FDX1 facilitates elesclomol-induced cuproptosis and promotes glioblastoma development via transcription factor NFKB1 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2025, 241: 117186.
- [82] VOLI F, VALLI E, LERRA L, et al. Intratumoral copper modulates PD-L1 expression and influences tumor immune evasion [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(19): 4129-44.
- [83] GUO B, YANG F, ZHANG L, et al. Cuproptosis induced by ROS responsive nanoparticles with elesclomol and copper combined with alphaPD-L1 for enhanced cancer immunotherapy [J]. *Adv Mater*, 2023, 35(22): e2212267.
- [84] NOH D, LEE H, LEE S, et al. Copper-based nanomedicines for cuproptosis-mediated effective cancer treatment [J]. *Biomater Res*, 2024, 28: 0094.
- [85] KONG R, SUN G. Targeting copper metabolism: a promising strategy for cancer treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1203447.
- [86] ORNING P, WENG D, STARHEIM K, et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death [J]. *Science*, 2018, 362(6418): 1064-9.
- [87] HOU W, XIE Y, SONG X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. *Autophagy*, 2016, 12(8): 1425-8.
- [88] AI Y, MENG Y, YAN B, et al. The biochemical pathways of apoptotic, necroptotic, pyroptotic, and ferroptotic cell death [J]. *Mol Cell*, 2024, 84(1): 170-9.
- [89] CHEN S, CHEN T, XU C, et al. Iron overload exaggerates renal ischemia-reperfusion injury by promoting tubular cuproptosis via interrupting function of LIAS [J]. *Redox Biol*, 2025, 86: 103795.
- [90] SAMIR P, MALIREDDI R K S, KANNEGANTI T D. The PANoptosome: a deadly protein complex driving pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis) [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 238.
- [91] KURIAKOSE T, MAN S M, MALIREDDI R K, et al. ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways [J]. *Sci Immunol*, 2016, 1(2): aag2045.