

GSDME 通过 p53、caspase3 增强小细胞肺癌细胞的紫杉醇敏感

高世华 李植锋 蔡键锋

摘要 目的 探讨 gasdermin 蛋白 E (gasdermin E, GSDME) 在小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 细胞系中的表达情况, 及 GSDME 增强 SCLC 对紫杉醇敏感的潜在机制。方法 以 16HBE 细胞为对照, 使用 RT-qPCR 和 WB 法分别检测 6 株 SCLC 细胞系 (H69、H146、H209、H446、H1688 和 H2227) 中 GSDME 的 mRNA 和蛋白水平。紫杉醇以不同的作用浓度和作用时间处理过表达 GSDME 的 H69 细胞 (H69-GSDME^{high}), CCK-8 及 WB 分析细胞生存率和细胞焦亡的情况。LDH 检测及流式细胞术检测紫杉醇作用下 H69-GSDME^{high} 细胞的焦亡情况。通过 caspase3 或 p53 抑制剂分别阻断其活化后, WB 分析紫杉醇对 H69-GSDME^{high} 细胞焦亡的影响。结果 在 6 株 SCLC 细胞系中 GSDME 的 mRNA 和蛋白水平均呈低表达 ($P < 0.01$), 且以 H69 细胞的表达量最低。紫杉醇能够显著抑制 H69-GSDME^{high} 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 促进 GSDME 被切割 ($P < 0.05$), 且均具有剂量依赖性。紫杉醇诱导过表达 GSDME 的 SCLC 细胞的死亡方式是细胞焦亡。Caspase3 抑制剂或 p53 抑制剂均能够显著降低紫杉醇导致的 GSDME 活化 ($P < 0.01$)。结论 GSDME 在 SCLC 中低表达, 提高细胞中 GSDME 的表达量能够有效增强细胞对紫杉醇的敏感度, 且该过程受 p53、Caspase3 活化的影响。

关键词 小细胞肺癌 细胞焦亡 GSDME caspase-3 p53 紫杉醇

中图分类号 R734.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.10.030

GSDME Enhances Paclitaxel Sensitivity in Small Cell Lung Cancer Cells by p53 or Caspase3. Gao Shihua, Li Zhifeng, Cai Jianfeng.

Department of Oncology, Affiliated Cancer Hospital, Shantou University Medical College, Guangdong 515000, China

Abstract Objective To investigate the expression of gasdermin protein E (GSDME) in small cell lung cancer (SCLC) cells and the mechanism of GSDME enhanced the sensitivity of SCLC to paclitaxel. **Methods** RT-qPCR was used to detect the mRNA and protein expressions of GSDME in SCLC cell lines, including H69, H146, H209, H446, H1688 and H2227. The proliferation and pyroptosis of H69-GSDME^{high} cell were analyzed by CCK-8 and WB after treated with different concentrations or times of paclitaxel. The pyroptosis of H69-GSDME^{high} cells was detected by LDH and flow cytometry. Blocking caspase3 or p53 activation by their inhibitors, the pyroptosis of H69-GSDME^{high} cell were analyzed by WB. **Results** The expressions of GSDME on SCLC cell lines were significantly lower than normal group ($P < 0.01$). Paclitaxel significantly inhibited the growth of H69-GSDME^{high} cells ($P < 0.05$) and promoted GSDME to be cleavage ($P < 0.05$) in a dose dependent manner. The paclitaxel could induced H69-GSDME^{high} cells to pyroptosis. Both caspase3 inhibitors or p53 inhibitors could significantly reduced paclitaxel-induced GSDME activation ($P < 0.01$). **Conclusion** GSDME was low expressed in SCLC. GSDME, which overexpressed in cells, could effectively enhance the sensitivity of SCLC cells to paclitaxel, and the p53 or caspase3 activation was involved in this process.

Key words Small cell lung cancer; Pyroptosis; GSDME; Caspase-3; p53; Paclitaxel

肺癌根据组织形态学特征可分为小细胞肺癌 (small-cell lung cancer, SCLC) 和非小细胞癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC), 其中 SCLC 占据肺癌的 15%~20%, 与 NSCLC 比较, SCLC 的侵袭性更强、早期转移率更高、预后效果更差^[1]。SCLC 对化疗较

为敏感, 第一疗程治疗后症状通常能得到改善, 但很快会产生多药耐药性, 导致其预后依然欠佳, 中位总生存期不足 6 个月^[2]。因此, 探究增强 SCLC 对化疗药物的敏感度具有重要意义。随着科技的发展, 多种细胞死亡形式被逐渐发现, 包括细胞坏死 (necrocytosis)、细胞凋亡 (apoptosis)、细胞自噬 (autophagy) 以及细胞焦亡 (pyroptosis) 等。其中, 细胞焦亡是一种介于凋亡与坏死之间的死亡方式, 发生速度快, 可诱发机体强烈的炎性反应。Gasdermin 蛋白 E (gasdermin

基金项目: 汕头大学医学院附属肿瘤医院院内青年科研基金项目 (2018A003)

作者单位: 515000 广州, 汕头大学医学院附属肿瘤医院肿瘤内科

通讯作者: 蔡键锋, 电子邮箱: 463212394@qq.com

E, GSDME)是细胞焦亡的最终执行蛋白,同时其剪切活化也是焦亡发生的标志^[3]。由于 GSDME 可介导化疗药物引起的组织损伤,肿瘤中 GSDME 的表达量较高,此肿瘤可能对化疗药物更为敏感^[4]。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种有丝分裂抑制剂,是近年来最有效的广谱化疗药物之一,治疗晚期 NSCLC 有效率高达 20%~42%^[5]。本研究拟探讨过表达 GSDME 在紫杉醇治疗 SCLC 中的增敏作用及其可能的分子机制。

材料与方法

1. 组织标本、细胞系和主要试剂:人小细胞肺癌细胞株(H69、H146、H209、H446、H1688、H2227)、人支气管上皮细胞株(16HBE)、过表达 GSDME 的 H69 细胞株(H69-GSDME^{high})购自广州赛业生物科技有限公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液($\times 100$)购自美国 Gibco 公司;p53 通路抑制剂(PFT- α)、caspase3 抑制剂(Ac-DEVD-CHO, DEVD)购自美国 Selleck 公司;GSDME、 β -actin 多克隆抗体购自上海圣克鲁斯生物技术公司;通用 RT-PCR 试剂盒、LDH 细胞毒性试剂盒、CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

2. 细胞培养:使用含 10% 小牛血清、1% 青链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基作为完全培养液,培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱中。

3. 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 GSDME 水平:利用 Trizol 法提取细胞总 RNA,测定浓度和纯度后,反转成 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 RT-qPCR,程序为预变性 95℃,10min,变性 95℃,10s,退火 60℃,20s,延伸 72℃,30s,40 个循环。以 GAPDH 为内参进行分析,使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析计算 GSDME 基因的相对表达量,每个样品均重复 3 次。引物:GSDME-上游引物:5'-CGTAGAGAGCCAGTCTTCATTT-3'; GSDME-下游引物:5'-GTTCCAGGACCATGAGTAGTTC-3'; GAPDH-上游引物:5'-CAAGGACCTCTACGCCAACAC-3'; GAPDH-下游引物:5'-TGGAGGCGCGATGATCTT-3'。

4. Western blot(WB)法检测 GSDME 蛋白表达:细胞分组处理后,收集细胞提取总蛋白,BCA 法测定蛋白裂解液浓度,取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白转至 PVDF 膜上。2% 脱脂牛奶封闭;一抗 4℃ 孵育过夜,洗膜后与二抗室温孵育 30min;洗膜后加 ECL 显影液,放入凝胶分析系统中曝光,拍照存储并用 Image J 软件分析计算各条带的灰度值,

以每组目的蛋白和内参蛋白灰度值的比值表示各组蛋白的表达水平。

5. 乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)检测:细胞经药物处理后,收集各孔的上清液 120 μ l,加入到一新的 96 孔板相应孔中,随即进行样品测定。用酶标仪测量 A450 值,根据标准曲线求出相应的 LDH 含量。具体步骤按试剂盒说明书操作。

6. CCK-8:收集对数生长期细胞,PBS 洗涤后使用完全培养基重悬,浓度调至 4 $\times 10^4$ 个细胞/毫升,以 100 微升/孔接种于 96 孔板。培养箱孵育过夜后,分别加入不同浓度的紫杉醇(0、30、60、80、100 μ mol/L)处理细胞,每组均有 6 个平行孔,药物作用时间分为 0、4、8、12、16h。在各组实验终止前 4h,加入现配的 CCK-8 溶液(10 微升/孔),孵育培养 4h 后,酶标仪测定 450nm 处的吸光度,计算存活率,绘制曲线。

7. 流式细胞术:使用不含 EDTA 胰酶消化并收集细胞,细胞筛过滤后进行计数,然后将细胞密度稀释调整为 1 $\times 10^6$ 个/毫升,用 0.3ml Buffer 缓冲液重悬细胞于流式。然后加 5 μ l Annexin V-FITC,室温避光染色 30min,再加 10 μ l PI 染液,室温避光染色 20min,通过流式细胞仪检测细胞焦亡情况。

8. 统计学方法:用 Graphpad Prism 8.0 统计学软件对数据进行统计分析,各组数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两两比较用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. GSDME 在 SCLC 细胞株中的表达:在 SCLC 细胞系 H69、H146、H209、H446、H1688、H2227 细胞中 GSDME mRNA 表达水平明显低于对照组 16HBE 细胞($P<0.01$,图 1A),且在 H69 细胞中的表达量最低(0.37 ± 0.03)。在各细胞系中,GSDME 蛋白表达水平的表达也显著低于对照组($P<0.01$,图 1B)。

2. 过表达 GSDME 增强 SCLC 细胞对紫杉醇的敏感度:与 H69 细胞组比较,经 30、60、80、100 μ mol/L 浓度紫杉醇处理后,H69-GSDME^{high} 细胞的生存率均显著降低($P<0.01$,图 2A);与 H69 细胞组比较,经紫杉醇作用 4、8、12、16h 后,H69-GSDME^{high} 细胞生存率均显著降低($P<0.05$,图 2B)。与 0 μ mol/L 紫杉醇处理组比较,GSDME-NT 水平在 30、60、80、100 μ mol/L 紫杉醇处理组均显著增加($P<0.01$);与 30 μ mol/L 紫杉醇处理组比较,GSDME-NT 水平在 60、80、100 μ mol/L 紫杉醇处理组均显著增加($P<0.05$);与 60 μ mol/L 紫杉醇处理组比较,GSDME-NT

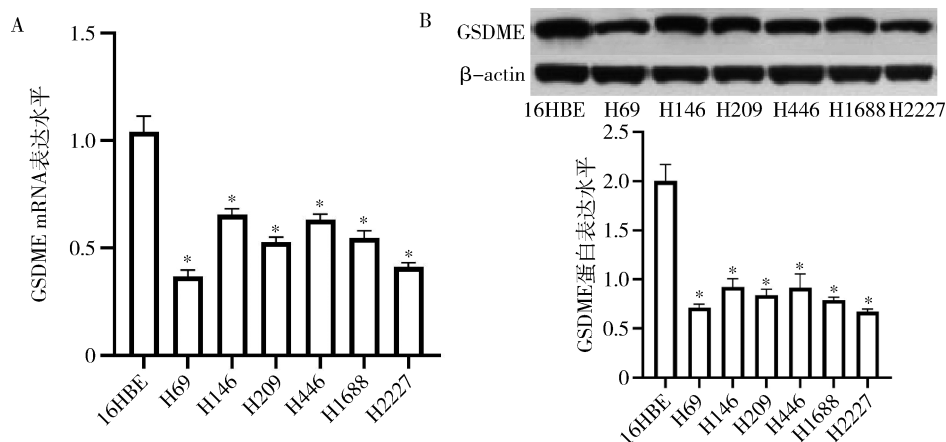


图1 GSDME在SCLC细胞株中的表达

A. SCLC细胞株中GSDME mRNA的表达量; B. SCLC细胞株中GSDME蛋白的表达量;与16HBE细胞比较, * $P < 0.01$

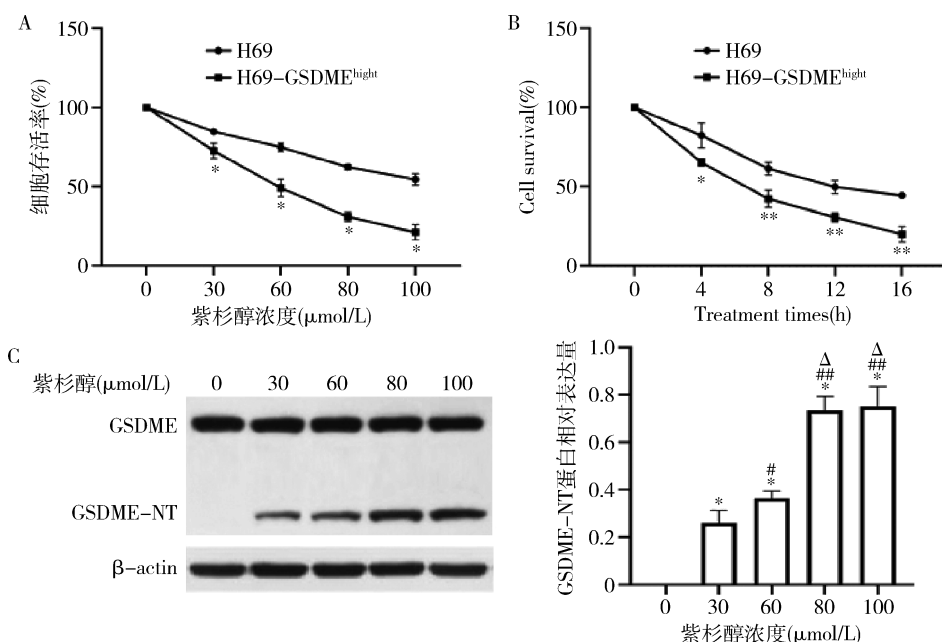


图2 紫杉醇影响SCLC细胞生存率和GSDME的切割

A. 紫杉醇处理剂量与细胞生存率的关系,与H69组比较, * $P < 0.01$; B. 紫杉醇处理时间与细胞生存率的关系,与H69组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; C. 紫杉醇诱发GSDME切割成GSDME-NT的剂量依赖性;与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P < 0.01$;与30 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与60 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, Δ $P < 0.01$

水平在80、100 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇处理组均显著增加 ($P < 0.01$,图2C)。

3. 紫杉醇诱导过表达GSDME的SCLC细胞发生细胞焦亡:紫杉醇处理(80 $\mu\text{mol/L}$,8h) H69-GSDME^{high}细胞后培养上清中LDH酶活为 $17.70 \pm 1.10 \text{ U/L}$,未处理组的LDH酶活力为 $5.53 \pm 0.53 \text{ U/L}$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图3A)。紫杉醇诱导H69-GSDME^{high}细胞死亡以焦亡(Annexin-V FITC+/IP+细胞)为主(图3B)。

4. 阻断p53或caspase3影响紫杉醇通过GSDME

介导SCLC细胞焦亡:使用caspase3抑制剂(DEVD, 10 $\mu\text{mol/L}$)和p53抑制剂(PFT- α , 10 $\mu\text{mol/L}$)分别对H69-GSDME^{high}细胞进行预处理,再经过紫杉醇(80 $\mu\text{mol/L}$)处理,观察各组细胞焦亡情况。与PTX处理组比较,PTX+DEVD处理组和PTX+PFT- α 处理组H69-GSDME^{high}细胞中的GSDME-NT水平均显著降低 ($P < 0.01$,图4)。

讨 论

SCLC是一种起源于支气管黏膜上皮的神经内分泌肿瘤,其特点是恶性程度高、侵袭性高、进展快、早

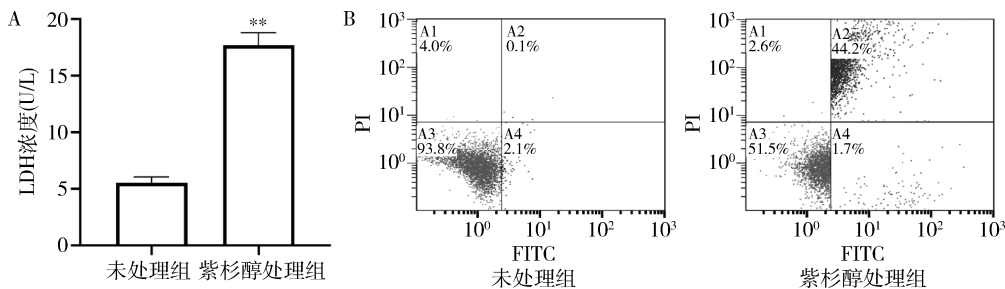


图 3 紫杉醇诱导 SCLC 细胞的死亡方式

A. LDH 水平检测,与未处理组比较,** $P < 0.01$;B. 流式细胞术检测 H69 - GSDME^{high} 细胞的死亡方式

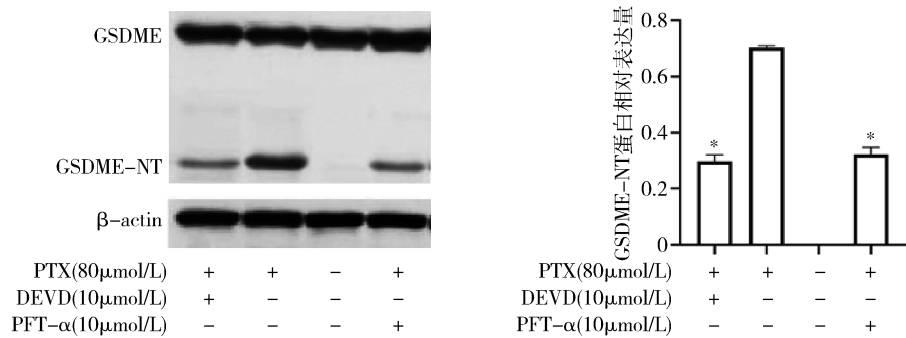


图 4 紫杉醇通过 p53、caspase3 活化 GSDME 介导 SCLC 细胞焦亡

PTX. 紫杉醇;DEVD. caspase3 抑制剂;PFT - α. p53 抑制剂;与 PTX 处理组比较,* $P < 0.01$

期出现远处转移,广泛期小细胞肺癌预后极差^[6]。目前,对 SCLC 的治疗没有绝对有效的方案,因此探究新的治疗方法提高生存收益具有重要意义。近年来,细胞焦亡被证实是一种新的细胞程序性死亡方式,通过 caspase 家族蛋白切割并激活 gasdermin 家族蛋白,进而导致细胞膜穿孔和破裂,引起细胞内容的释放诱导细胞死亡,并且伴随强烈的炎症反应^[7]。已有多项研究报道 GSDME 介导了肿瘤患者化疗时的细胞焦亡^[8]。本研究通过检测多株 SCLC 细胞中的 GSDME 的表达量,分析 GSDME 与 SCLC 的相关性。与对照相比较,SCLC 肿瘤细胞系中 DSDME 的 mRNA 水平和蛋白水平均显著下调,说明 GSDME 的表达与 SCLC 的发生、发展可能存在关系。

临床上一线治疗对大多数 SCLC 患者均有较好的疗效,但是在治疗后 2 年内复发的患者甚多,尤其是广泛期患者 2 年复发率接近 100%,患者复发后的平均生存时间也极低^[9]。因此在患者体能状态允许情况下,临床多推荐建议复发者采纳二线化疗法,以期延长患者总生存期和无进展生存时间,减少肿瘤负荷。目前,二线化疗方案多是选择伊立替康、紫杉醇、多西他赛、吉西他滨中的一种药物与铂类联合用药^[10]。化疗药物可通过细胞凋亡和继发性坏死等一

系列调控细胞死亡途径诱导癌细胞死亡,有研究指出化疗药物诱导细胞焦亡过程由 GSDME 介导^[11]。GSDME 蛋白表达水平在不同肿瘤细胞中存在差异,其本底表达水平与化疗药物敏感度有着密切联系^[12]。GSDME 在大多数肿瘤组织中表达缺失或发生突变,有研究显示上调 GSDME 在肝细胞癌中的表达可使其增殖被显著抑制^[13]。因此,本研究探讨了紫杉醇在过表达 GSDME 的 SCLC 肿瘤细胞的作用效果,结果显示过表达 GSDME 能够增强 SCLC 细胞对紫杉醇的敏感度。

细胞焦亡和凋亡是细胞程序性死亡的两种形式。与凋亡相反,细胞焦亡是肿瘤细胞继发性坏死的主要形式,它是由 caspase - 3 依赖性的 GSDME 裂解引起的。GSDME 蛋白裂解产生的 GSDME - NT 可在细胞膜上成孔,电解质失去平衡,细胞内容物外泄,进而导致细胞继发性坏死/焦亡,因此 GSDME - NT 也被认为细胞焦亡的标志性蛋白^[14]。已知化疗药物可以通过激活 caspase - 3 介导的细胞凋亡来杀死细胞,Wang 等^[11]研究发现,化疗药物在体外诱导 GSDME 细胞凋亡,使其被 caspase - 3 裂解,该机制被认为是在细胞凋亡后引起继发性坏死。GSDME 是抑癌基因 p53 的转录调控靶点,协同 p53 参与了肿瘤细胞的

DNA 损伤应激等^[15]。本研究通过 caspase-3 抑制剂和 p53 抑制剂分别处理过表达 GSDME 的 SCLC 细胞,会显著降低紫杉醇导致的 GSDME 活化,即阻断紫杉醇诱导 SCLC 细胞的焦亡。

综上所述,GSDME 在 SCLC 中低表达,体外通过过表达细胞中 GSDME 的表达,能够有效增强 SCLC 细胞对紫杉醇的敏感度,且该过程受 p53、caspase-3 活化的影响。本研究结果表明 GSDME 在 SCLC 的治疗中具有一定的研究价值,为深入了解 SCLC 的发病机制提供了理论依据。

参考文献

- 1 Drapkin BJ, Rudin CM. Advances in small - cell lung cancer (SCLC) translational research[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2021, 11(4): a038240 - a038268
- 2 Taniguchi H, Sen T, Rudin CM. Targeted therapies and biomarkers in small cell lung cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10(5): 741 - 748
- 3 Ruan J, Wang S, Wang J. Mechanism and regulation of pyroptosis - mediated in cancer cell death[J]. Chem Biol Interact, 2020, 323(5): 109052 - 109063
- 4 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): 1907 - 1916
- 5 杨新杰, 张卉, 农靖颖, 等. 紫杉醇脂质体联合顺铂方案一线治疗晚期非小细胞肺癌的临床随机对照研究[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(4): 208 - 212
- 6 黄鲁众, 张晓晔, 崔国元, 等. 43 例局限期小细胞肺癌术后预后分析[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(5): 94 - 97, 36

- 7 Tsoukalas N, Aravantinou - Fatorou E, Baxevanos P, *et al.* Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations[J]. Ann Transl Med, 2018, 6(8): 145 - 153
- 8 Fang Y, Tian S, Pan Y, *et al.* Pyroptosis: a new frontier in cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121(1): 109595 - 109602
- 9 崔晓霞, 宋鹏, 张力. 小细胞肺癌诊疗新进展[J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(6): 355 - 362
- 10 赵燕仪, 卜庆, 李康慧, 等. 不同化疗方案对肺癌合并慢性肾衰竭患者肾功能的影响[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(4): 136 - 139
- 11 Wang Y, Gao W, Shi X, *et al.* Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase - 3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature, 2017, 547(7661): 99 - 103
- 12 Zhang CC, Li CG, Wang YF, *et al.* Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase - 3/GSDME activation[J]. Apoptosis, 2019, 24(3 - 4): 312 - 325
- 13 Zhang Z, Zhang Y, Xia S, *et al.* Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti - tumour immunity[J]. Nature, 2020, 579(7799): 415 - 420
- 14 Jiang M, Qi L, Li L, *et al.* The caspase - 3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer[J]. Cell Death Discov, 2020, 6(10): 112 - 123
- 15 Zhang J, Chen Y, He Q. Distinct characteristics of dasatinib - induced pyroptosis in gasdermin E - expressing human lung cancer A549 cells and neuroblastoma SH - SY5Y cells[J]. Oncol Lett, 2020, 20(1): 145 - 154

(收稿日期: 2021 - 05 - 07)

(修回日期: 2021 - 05 - 21)

超声诊断乳腺导管原位癌伴微浸润腋窝淋巴结状态的临床应用价值

史 瑶 原韶玲 武壮壮 史泽洪

摘 要 目的 探讨超声在诊断乳腺导管原位癌伴微浸润(breast ductal carcinoma in situ with micro - invasion, DCISM)患者腋窝淋巴结(axillary lymph node, ALN)状态中的临床应用价值。**方法** 回顾性分析山西省肿瘤医院 2015 年 1 月 ~ 2020 年 12 月经手术病理证实的 DCISM 患者 93 例,术前均常规行乳腺及同侧腋窝淋巴结超声检查,术后腋窝淋巴结送病检,以术后病理结果为金标准,将 ALN 分为转移组和未转移组,对超声所显示的两组淋巴结声像图特征等行对比分析,并使用受试者工作特性(ROC)曲线进行分析和评价。**结果** 本组 93 例 DCISM 患者,共有 9 例发生腋窝淋巴结转移(axillary lymph node metastasis, ALNM),淋巴结转移率为 9.68%;术前超声共检出 53 例淋巴结肿大,ALN 的超声检出率为 57.0%。超声诊断 DCISM 患者 ALNM

作者单位:030001 太原,山西医科大学医学影像学院(史瑶、武壮壮、史泽洪);030001 太原,山西省肿瘤医院超声科(史瑶、原韶玲、武壮壮、史泽洪)

通讯作者:原韶玲,主任医师,电子信箱:yuanshaoling08@sina.com