DOI:10.16016/j.1000-5404.202104196

烟草烟雾提取物激活 NLRP3 炎性小体促进肺腺癌 PC-9 细胞侵袭

李久康,陈 虹 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科

[摘要] **目的** 探讨烟草烟雾(cigarette smoke extract, CSE)提取物对肺腺癌 PC-9 细胞侵袭能力的影响及机制。**方法** 体外培养 PC-9 细胞,与 0%、1%、2%、4%烟草烟雾提取物共培养 96 h。Transwell 实验检测细胞侵袭能力,Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 及 MMP-2 蛋白表达。予以 4%烟草烟雾提取物与 MCC950(NLRP3 抑制剂)共同处理 96 h 后,细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力,Western blot 检测 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 及 MMP-2 蛋白表达。**结果** 与对照组相比,烟草提取物处理组中发生侵袭的 PC-9 细胞数量呈浓度(1%~4% CSE)依耐性增多($P<0.05$,$P<0.01$)。NLRP3、Caspase-1、IL-1β 及 MMP-2 的蛋白水平在烟草提取物处理组中呈浓度依耐性上调($P<0.01$)。MCC950 干预后,可显著抑制烟草烟雾提取物诱导的 PC-9 侵袭细胞的增多($P<0.05$)以及 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、MMP-2 表达的上调($P<0.05$)。**结论** 烟草烟雾提取物可增强肺腺癌细胞侵袭能力,可能与激活 NLRP3 炎性小体有关。

[关键词] 烟草烟雾提取物;肺腺癌;NLRP3 炎性小体;侵袭
[中图法分类号] R363.13; R730.23; R734.2 [文献标志码] A

Cigarette smoke extract activates NLRP3 inflammasome to promote invasion of lung adenocarcinoma PC-9 cells

LI Jiukang, CHEN Hong Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and underlying mechanism of cigarette smoke extract (CSE) on invasion ability of lung adenocarcinoma PC-9 cells. **Methods** PC-9 cells were cultured in the medium containing 0%, 1%, 2% and 4% tobacco smoke extract for 96 h, respectively. The invasive ability of the cells was detected by Transwell assay. The protein levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and MMP-2 were measured with Western blotting. After co-treatment with 4% CSE and NLRP3 inhibitor, MCC950, for 96 h, Transwell assay was employed again for the invasive ability of the cells, and Western blotting for the expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and MMP-2. **Results** CSE significantly increased the invasive ability of PC-9 cells ($P<0.05$, $P<0.01$) and promoted the protein expression of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and MMP-2 ($P<0.01$) in dose-dependent manners. The intervention of MCC950 obviously inhibited the enhanced invasive ability of PC-9 cells and the up-regulation of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and MMP-2 induced by CSE. **Conclusion** CSE enhances the invasive ability of lung adenocarcinoma cells, which may be associated with the activation of NLRP3 inflammasome.

[**Key words**] cigarette smoke extract; lung adenocarcinoma; NLRP3 inflammasome; invasion

Corresponding author: CHEN Hong, E-mail: hopehong2003@126.com

[通信作者] 陈 虹, E-mail: hopehong2003@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一[1]。2018 年全球癌症统计数据显示中国诊断肺癌 104 万人,因肺癌致死 92.1 万人[2]。肿瘤细胞的侵袭是肿瘤细胞恶性行为之一,是导致患者不良预后的主要原因[3]。有研究发现烟草烟雾(cigarette smoke extract, CSE)暴露与肺癌细胞侵袭、转移密切相关[4-5],但具体机制不明。近年来炎症反应在肿瘤侵袭、转移中的作用被广泛关注[6],NLRP3 炎症小体是一种由细胞内免疫受体 NLRP3、连接蛋白 ASC 和蛋白酶 Caspase-1 组成的多蛋白复合物。该复合物的组装可诱导 IL-1β 促炎症因子的成熟和分泌,从而启动和参与炎症反应的核心环节[7]。研究表明,激活 NLRP3 炎症小体在促进肺癌细胞 A549 增殖、迁移、侵袭中发挥重要作用[8]。然而,NLRP3 炎症小体在烟草烟雾暴露诱导的肺癌侵袭中的作用还少见报道。本研究探讨烟草烟雾提取物对 PC-9 细胞侵袭,以及对 PC-9 细胞中 NLRP3 炎性小体复合物和 MMP-2 表达的影响,再通过 MCC950 抑制 NLRP3 炎性小体活性,观察烟草烟雾提取物对 PC-9 细胞侵袭的影响,以期发现烟草烟雾暴露诱导肺癌侵袭性增强的机制并寻找新的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肺腺癌细胞(PC-9)来源于何勇教授实验团队(陆军军医大学第三附属医院呼吸科实验室)。高糖 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培养基和胎牛血清购自澳洲 GIBCO;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;Matrigel 胶购自美国 BD 公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒购自碧云天生物技术研究所;PVDF 膜购自美国 Milipore;NLRP3、GAPDH、MMP-2 抗体以及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购于美国 Abcam;Caspase-1/p20, mature IL-1β 由中国万类生物有限公司提供;MCC950 购自美国 Med Chem Express Co;龙凤呈祥牌香烟购自重庆烟草公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及烟草烟雾制备 配制含 10%胎牛血清的完全培养基用于体外培养 PC-9 细胞。于培养箱中(培养条件:37 ℃,5% CO_2 及饱和湿度)培养 2~3 d,当细胞融合度达到 80%时进行传代,选择对数生长期的细胞进行后续实验。龙凤呈祥牌香烟(焦油 11 mg;一氧化碳 17 mg;尼古丁 1.1 mg)用于制备烟草烟雾提取物。具体制备方法详见文献[9]:点燃香烟,去滤嘴,并安放于自动抽吸泵上,使烟雾通过 10 mL 无血清的 DMEM 培养基,以 DMEM 培养基中产生大小均匀的气泡、每支香烟燃烧 2 min 为度,当 10 支香烟产生的烟雾通过该培养基后停止抽吸。调节 pH 值至 7.4,使用 0.22 μm 的过滤器除去杂质和细菌,即得到 CSE。使用 Beckman DU 640 分光计(美国),于 320 nm 处测定光密度值,为(1.36±0.12),CSE 浓度为 100%。根据实验需要使用 DMEM 培养基将 100% CSE 稀释至 1%,2%和 4% CSE。烟草提取物最好现配现用,尽量在制备好 30 min 内使用。

1.2.2 细胞侵袭实验 将 Matrigel 胶稀释 8 倍后,包被 Transwell 上层小室底部膜的上室面,置于 37 ℃放置 30 min,使其聚合成凝胶。根据实验需求将 PC-9 细胞分为对照组、MCC950 组、4% CSE 组、4% CSE + MCC950 组。其中对照组不做任何处理,MCC950 组加入 10 μmol/L MCC950 共培养,4%CSE 组加入 4%CSE 共培养,4%CSE+MCC950 组先加入 10 μmol/L MCC950 预处理 1 h,再加入 4% CSE 共培养,96 h 后,将贴壁的细胞消化后,制备成细胞悬液。向 Transwell 上层小室中加入不含血清的培养基并植入 5×10^4 个 PC-9 细胞,下层小室中加入含 20%胎牛血清的完全培养基。常规培养 48 h,取出 Transwell 上层小室,用 PBS 清洗 2 次,0.1%结晶紫染色 30 min,用棉签擦掉上层未迁移的细胞,400 倍显微镜下随机选择 5 个视野观察细胞并计数。

1.2.3 Western blot 实验 收集 PC-9 细胞,并加入细胞裂解液(PARP:PMSF = 100:1)100 μL 并于冰上裂解 30 min,随后于 4 ℃低温离心机中以 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,测定蛋白浓度 (BCA 法),加上样缓冲液(碧云天科技公司)煮沸 10 min,使蛋白变性。将蛋白样品液加入 SDS-PAGE 凝胶上样孔进行电泳分离蛋白质(电泳条件:80 V 恒压电泳 30 min,待蛋白进入分离胶,调整电压至 120 V 恒压电泳 1 h)。转膜(200 mA 恒流转膜 2 h),于室温下用 5%的脱脂牛奶封闭蛋白膜 2 h。一抗 4 ℃孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜 3 次。加二抗于室温下孵育 2 h,滴上超敏发光底物液于蛋白膜上显示荧光,用凝胶成像仪(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)捕捉荧光并成像。运用凝胶成像分析系统计算条带的灰度值,目的条带灰度值/内参灰度值=蛋白质相对表达水平。

1.3 统计学分析

使用 Graphpad Prism 5.01 软件对实验数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析和 Student-t 检验,多重比较采用 Turkey's 检验。当 $P<0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CSE 诱导肺腺癌 PC-9 细胞侵袭性增加

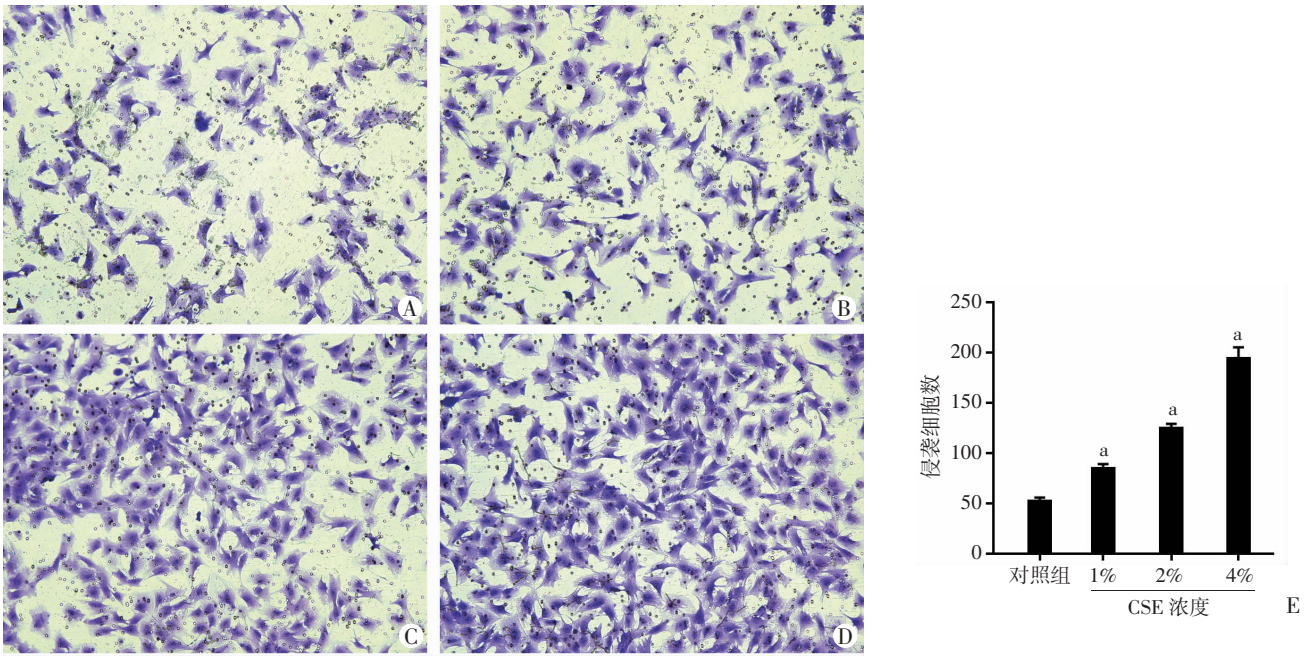
将 1%、2%、4% CSE 与 PC-9 细胞共培养 96 h 后,检测细胞侵袭性。Transwell 实验结果示:与正常对照组(0% CSE)相比,经 1%、2%、4% CSE 处理后发生侵袭的 PC-9 细胞明显增加,细胞侵袭能力呈浓度依赖性增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

2.2　CSE 诱导 PC-9 细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-β 和 MMP-2 表达增加

将 1%、2%、4% CSE 与 PC-9 细胞共培养 96 h 后,Western blot 检测 PC-9 细胞中 NLRP3、Caspase-1、IL-β 和 MMP-2 蛋白水平。Western blot 实验结果示:与正常对照组(未经 CSE 处理)相比,经 1%、2%、4% CSE 处理后 PC-9 细胞中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 MMP-2 蛋白表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

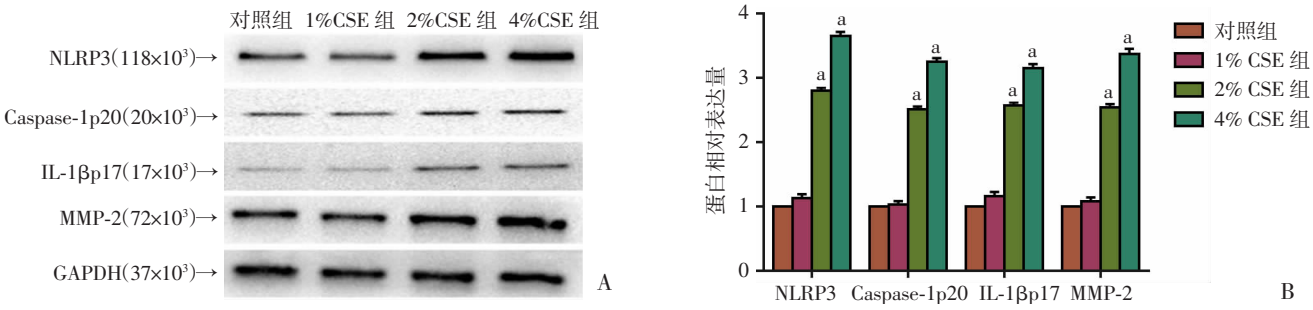
2.3　MCC950 可以逆转 CSE 诱导的 PC-9 细胞侵袭性增强

MCC950 是一种有效、选择性的 NLRP3 抑制剂。将 10 μmol/L MCC950 加入 PC-9 细胞中预处理 1 h,再加入 4% CSE 共培养 96 h 后,检测细胞侵袭性。Transwell 实验结果示:与正常对照组相比,4% CSE 处理后发生侵袭的 PC-9 细胞明显增加,MCC950 干预后,可显著减少发生侵袭的 PC-9 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



A~D:倒置显微镜下观察侵袭的细胞(×200);A:对照组;B~D:分别为 1%、2%、4% CSE 处理组;E:统计分析发生侵袭的细胞数　a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1　倒置显微镜下观察 CSE 对 PC-9 细胞侵袭能力的影响



A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.01$,与对照组比较

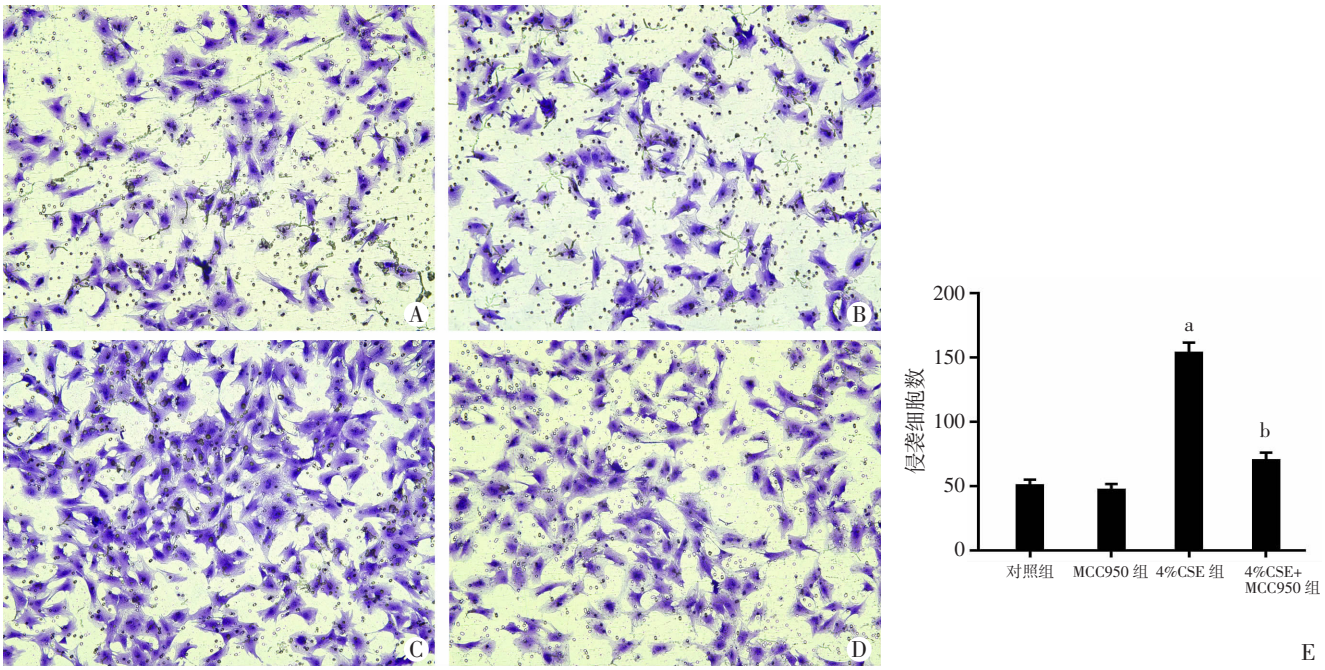
图 2　Western blot 检测 NLRP3 炎性小体相关蛋白表达

2.4　MCC950 抑制 CSE 诱导 PC-9 细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-β 和 MMP-2 表达增加

将 10 μmol/L MCC950 加入 PC-9 细胞中预处理 1 h,再加入 4% CSE 共培养 96 h 后,Western blot 检测 PC-9 细胞中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 MMP-2 蛋白水平。Western blot 实验结果示:与正常对照组相比,4.0% CSE 处理后 PC-9 细胞中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 MMP-2 蛋白表达明显升高,经 MCC950 干预后,可显著抑制 CSE 诱导的 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 MMP-2 蛋白表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

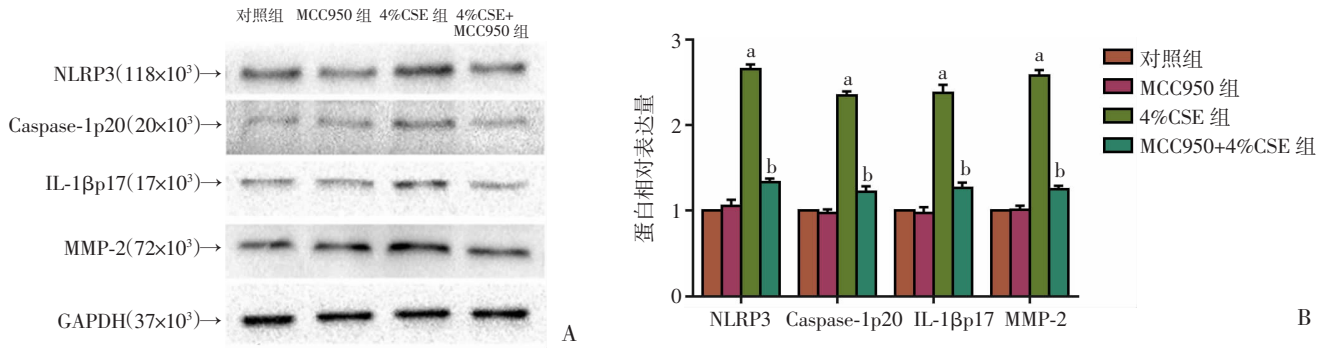
3　讨论

肿瘤细胞侵袭、转移是肿瘤的恶性行为之一,也是导致患者不良预后及死亡的主要原因[10-12]。烟草烟雾成分中至少含有 69 种致癌物质,包括氨、镉、镍、尼古丁、稠环芳香烃和 N-亚硝基胺等,不仅会导致癌症,还与肿瘤的侵袭和转移的发生密切相关[3]。吸烟会增加前列腺癌转移的风险[13],烟草烟雾暴露增加乳腺癌细胞转移能力[14]。有研究报道烟草烟雾提取可增强肺癌细胞的侵袭和转移能力[15]。与既往的文献报道一致的是,本研究发现 CSE 诱导肺癌 PC-9 细胞侵袭能力呈浓度依赖性增强。



A~D:倒置显微镜下观察发生侵袭的 PC-9 细胞(×200);A:对照组;B~D:分别为 MCC950、4%CSE、4%CSE+MCC950 处理组;E:统计分析发生侵袭的细胞数　a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 4%CSE 组比较

图 3　倒置显微镜下观察 CSE 和 MCC950 对 PC-9 细胞侵袭能力的影响



A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 4%CSE 组比较

图 4　Western blot 检测 NLRP3 炎性小体相关蛋白及 MMP-2 蛋白表达

炎症在肿瘤的侵袭、转移中发挥重要作用。研究表明,慢性炎症可触发一系列分子事件,导致分化细胞恶性转化,抑制抗肿瘤免疫,最终导致肿瘤的发生和转移[16-17]。炎性小体是炎症反应中重要组成部分。NLRP3 炎症体是由细胞内固有免疫受体 NLRP3、接头蛋白 ASC 和蛋白酶 Caspase-1 组成的多蛋白复合体。这种复合体的组装可以诱导促炎因子如 IL-1β 的成熟和分泌,从而促进炎症反应的发生[7]。烟草烟雾中含有大量的活性氧和有毒物质,可促进机体组织发生炎症反应。研究发现 CSE 可以激活 NLRP3 炎性小体诱导人支气管上皮细胞焦亡[18]。本研究也发现,CSE 提取物可诱导肺腺癌细胞中 NLRP3 炎性小体活化。

既往的研究表明 NLRP3 炎性小体的激活与肿瘤的侵袭、转移密切相关[19]。DENG 等[20]发现在乳腺癌细胞中损伤的、产生 ROS 的线粒体聚集激活 NLRP3 炎性小体,导致可溶性细胞因子的异常分泌,进而促进破骨细胞的分化和成熟,最终导致骨转移。有研究报道细菌脂多糖(LPS)激活 NLRP3 炎性小体并促进肿瘤的侵袭和转移[21]。基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)是 MMPs 家族的主要成员之一,其降解细胞外基质的功能特点为肿瘤侵入组织与转移提供了条件[22]。活化的 NLRP3 炎症小体可促进 MMP-2 的产生[23]。本研究发现,CSE 提取物可诱导肺腺癌 PC-9 细胞中 MMP-2 表达增加,抑制 NLRP3 的活性可显著降低 CSE 诱导的 PC-9 侵袭活性与 MMP-2 的表达。

综上所述,烟草烟雾暴露可以促进肺腺癌细胞 PC-9 侵袭性增加,其机制可能是通过激活 NLRP3 炎性小体,诱导 MMP-2 表达来介导肺腺癌 PC-9 细胞侵袭。通过研究 NLRP3 炎性小体在烟草烟雾提取物诱导的肺癌细胞侵袭中的作用,将为烟草烟雾暴露诱导的肺癌细胞转移的治疗提供新的思路和靶点。

参考文献:

[1] LIAO H L, LIANG Y Q, KANG L, *et al*. miR-454-3p inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation and metastasis by targeting $TGFB_2$[J]. Oncol Rep, 2021, 45(5): 67. DOI: 10.3892/or.2021.8018.

[2] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, *et al*. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun, 2019, 39(1): 22. DOI: 10.1186/s40880-019-0368-6.

[3] LIAO K, YONG C W, HUA K. SB431542 inhibited cigarette smoke extract induced invasiveness of A549 cells *via* the TGF-β1/Smad2/MMP3 pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 9681-9686. DOI: 10.3892/ol.2018.8556.

[4] GOPALAKRISHNA R, CHEN Z H, GUNDIMEDA U. Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(25): 12233-12237. DOI: 10.1073/pnas.91.25.12233.

[5] 师萌, 王晓慧, 邓亚菲, 等. 烟草诱导的 M2 型巨噬细胞对肺癌细胞侵袭转移的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(6): 1107-1113.
SHI M, WANG X H, DENG Y F, *et al*. The effects of CSE-induced M2 polarized macrophages on lung carcinoma invasion and migration[J]. Chin J Cell Biol, 2019, 41(6): 1107-1113.

[6] GOMEZ-LARRAURI A, OURO A, TRUEBA M, *et al*. Regulation of cell growth, survival and migration by ceramide 1-phosphate—implications in lung cancer progression and inflammation[J]. Cell Signal, 2021, 83: 109980. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.109980.

[7] SHAO B Z, WANG S L, PAN P, *et al*. Targeting NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel disease: putting out the fire of inflammation[J]. Inflammation, 2019, 42(4): 1147-1159. DOI: 10.1007/s10753-019-01008-y.

[8] WANG X, SHAO Q H, ZHOU H, *et al*. Ginkgolide B inhibits lung cancer cells promotion *via* beclin-1-dependent autophagy[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 194. DOI: 10.1186/s12906-020-02980-x.

[9] 廖科, 陈虹, 赵绿翠, 等. 磷脂转运蛋白参与烟草提取物诱导的Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(7): 941-946. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.07.03.
LIAO K, CHEN H, ZHAO L C, *et al*. Role of phospholipid transfer protein in cigarette smoke-induced apoptosis of RLE-6TN cells[J]. J South Med Univ, 2015, 35(7): 941-946. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.07.03.

[10] LOPEZJ I, CAMENISCH T D, STEVENS M V, *et al*. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6755-6763. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0863.

[11] LI Y, LIU H, HUANGY Y, *et al*. Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(5): 1234-1242. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1292.

[12] LI Y, LI Y, LIU J, *et al*. Expression levels of microRNA-145 and microRNA-10b are associated with metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016, 17

(3): 272-279. DOI: 10.1080/15384047.2016.1139242.

[13] MOREIRAD M, ARONSON W J, TERRIS M K, *et al*. Cigarette smoking is associated with an increased risk of biochemical disease recurrence, metastasis, castration-resistant prostate cancer, and mortality after radical prostatectomy: results from the SEARCH database[J]. Cancer, 2014, 120(2): 197-204. DOI: 10.1002/cncr.28423.

[14] DI CELLO F, FLOWERSV L, LI H L, *et al*. Cigarette smoke induces epithelial to mesenchymal transition and increases the metastatic ability of breast cancer cells[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 90. DOI: 10.1186/1476-4598-12-90.

[15] GOPALAKRISHNA R, CHENZ H, GUNDIMEDA U. Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(25): 12233-12237. DOI: 10.1073/pnas.91.25.12233.

[16] SONG X L, WEI C R, LI X Q. The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 95: 107544. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107544.

[17] 买新佳, 黄婧娟, 陈洪雷. 新兴免疫检查点 VISTA 在肿瘤与炎症中的作用[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(2): 275-279. DOI: 10.14188/j.1671-8852.2019.0311.
MAI X J, HUANG J J, CHEN H L. Function of an emerging immune checkpoint-VISTA in the cancer and inflammation[J]. Med J Wuhan Univ, 2020, 41(2): 275-279. DOI: 10.14188/j.1671-8852.2019.0311.

[18] ZHANG M Y, JIANG Y X, YANG Y C, *et al*. Cigarette smoke extract induces pyroptosis in human bronchial epithelial cells through the ROS/NLRP3/caspase-1 pathway[J]. Life Sci, 2021, 269: 119090. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119090.

[19] 阮萍. 炎症小体 NLRP3 在肿瘤中的作用[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(1): 23-25. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2021.01.008.
RUAN P. The role of NLRP3 inflammasome in tumor[J]. J Med Theory Pract, 2021, 34(1): 23-25. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2021.01.008.

[20] DENG R, ZHANGH L, HUANG J H, *et al*. MAPK1/3 kinase-dependent ULK1 degradation attenuates mitophagy and promotes breast cancer bone metastasis[J]. Autophagy, 2020: 1-19. DOI: 10.1080/15548627.2020.1850609.

[21] LINY S, TSAI K L, CHEN J N, *et al*. Mangiferin inhibits lipopolysaccharide-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances the expression of tumor suppressor gene PER1 in non-small cell lung cancer cells[J]. Environ Toxicol, 2020, 35(10): 1070-1081. DOI: 10.1002/tox.22943.

[22] WANG M, NAIM H, HUANG R Y, *et al*. High-throughput functional profiling of single adherent cells *via* hydrogel drop-screen[J]. Lab Chip, 2021, 21(4): 764-774. DOI: 10.1039/d0lc01294g.

[23] MCALLISTERM J, CHEMALY M, EAKIN A J, *et al*. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis[J]. Osteoarthr Cartilage, 2018, 26(5): 612-619. DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.901.

(**收稿**:2021-04-29;**修回**:2021-07-05)

(编辑 邓强庭)