DOI:10.16016/j.1000-5404.202105010

副交感神经 M1 受体通过 Caspase-1/GSDMD 通路调控前列腺癌细胞焦亡

陈津滢,张 咪,曾 燕,黄燕萍,陈芳芳,王千慧,徐 晨 400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院

[摘要] **目的** 探讨副交感神经 M1 受体(muscarinic acetylcholine M1 receptor,CHRM1)对前列腺癌细胞焦亡的影响及其可能的分子机制。**方法** 在 PC-3 细胞中分别于 12、24、48 h 加入不同浓度 CHRM1 特异性抑制剂哌仑西平(pirenzepine,PIN)和激动剂氯贝胆碱(bethanechol,BECH),后用慢病毒感染 PC-3 细胞构建 CHRM1 敲低的稳转株,再用质粒转染构建成孔蛋白 gasdermin D(GSDMD)的敲低细胞模型,CCK-8 实验检测细胞增殖能力,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)细胞毒性检测试剂检测 LDH 释放水平,流式细胞术及荧光倒置显微镜下观察 Hoechst-PI 和 Annexin V-PI 双染后的 PI 阳性细胞率,通过透射电镜观察细胞焦亡现象,Western blot 检测 Caspase-1/GSDMD 通路相关分子的表达水平。**结果** CHRM1 特异性抑制剂哌仑西平及慢病毒敲低 CHRM1 可使前列腺癌细胞 PC-3 细胞活力下降($P<0.05$),PI 阳性细胞数显著增加($P<0.01$),同时在透射电镜下可观察到明显细胞焦亡现象,而相对的加入激动剂氯贝胆碱可使其细胞活力在一定浓度范围内上升($P<0.05$),PI 阳性细胞率减少($P<0.01$);通过药物和慢病毒下调 CHRM1 之后,Caspase-1/GSDMD 通路中的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、天冬氨酸蛋白水解酶剪切体-1(cleaved Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、炎症复合体(NLRP3)及 GSDMD 水平明显上升($P<0.05$);敲低 GSDMD 之后,PI 阳性细胞率降低($P<0.05$),LDH 释放率降低($P<0.001$),各相关蛋白水平显著下降($P<0.01$),且抑制或敲低 CHRM1 后 PI 阳性细胞率、LDH 释放率及各相关蛋白水平无明显回复。**结论** 下调 CHRM1 可通过 Caspase-1/GSDMD 通路诱导前列腺癌细胞焦亡。

[关键词] 细胞焦亡;副交感神经 M1 受体;前列腺癌;Caspase-1;GSDMD
[中图法分类号] R394.2; R730.23; R737.25 [文献标志码] A

Muscarinic acetylcholine M1 receptor regulates pyroptosis of prostate cancer cells through Caspase-1/GSDMD pathway

CHEN Jinying, ZHANG Mi, ZENG Yan, HUANG Yanping, CHEN Fangfang, WANG Qianhui, XU Chen
Institution of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of muscarinic acetylcholine M1 receptor (CHRM1) on pyroptosis of prostate cancer cells and investigate its possible molecular mechanism. **Methods** Pirenzepine (PIN), a specific CHRM1 antagonist, and bethanechol (BETH), its agonist, were used to treat PC-3 cells at different doses for different time periods (12, 24 and 48 h). Then a stable PC-3 cell strain cells with CHRM1 knockdown was established by lentivirus infection. A knockdown cell model of gasdermin D (GSDMD) was constructed by plasmid transfection. Cell proliferation ability was detected by CCK8 assay, LDH release level was measured by lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay, and the rate of PI positive cells after staining with Hoechst-PI and Annexin V-PI was observed by flow cytometry and fluorescence inversion microscopy. Cell pyroptosis was observed by transmission electron microscopy and protein expression levels related to pyroptosis pathway were detected by Western blotting. **Results** The specific inhibitor of CHRM1, pirenzepine, and lentivirus knockdown of CHRM1 reduced the cell viability of PC-3 cells ($P<0.05$), and increased the rate of PI positive cells significantly ($P<0.01$). At the same time, the phenomenon of cell pyroptosis was observed under

[基金项目] 重庆市自然科学基金(cstc2009BA5081)
[通信作者] 徐 晨,E-mail:xuchen@cqmu.edu.cn

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/)

electron microscope, and the treatment of the BETH enhanced the cell viability ($P<0.05$) and reduced the rate of PI positive cells in a certain concentration range ($P<0.01$). After the down-regulation of CHRM1 by drugs and lentiviruses, the proteins levels of Caspase-1/GSDMD pathway, Caspase-1, cleaved Caspase-1, apoptosis associated speck-like protein (ASC), NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) and GSDMD were significantly increased ($P<0.05$). After the GSDMD was knocked down, the rate of PI positive cells was decreased ($P<0.05$), LDH release was reduced ($P<0.001$), and the levels of related proteins were reduced significantly ($P<0.01$). Treatment of CHRM1 inhibitor or knockdown of CHRM1 had no effects on the rate of PI positive cells, LDH release, and the levels of related proteins. **Conclusion** Down-regulation of CHRM1 induces pyroptosis of prostate cancer cells through Caspase-1/GSDMD pathway.

[**Key words**] cell pyroptosis; muscarinic acetylcholine M1 receptor; prostate cancer; Caspase-1; GSDMD

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2009BA5081). Corresponding author: XU Chen, E-mail: xuchen@cqmu.edu.cn

前列腺癌是全球范围内男性第二大常见癌症,也是男性死亡的主要原因[1]。目前对其病因所知甚少,仅有少数风险因素被确定。因此,挖掘前列腺癌更多的发病原因和具体机制对于更有效地诊治前列腺癌患者至关重要[2]。大量研究表明,自主神经系统可支配癌症的进程[3-4],我们前期的研究发现交感神经 β2 肾上腺素受体与前列腺癌转移及肿瘤细胞的凋亡密切相关[5]。此外,有研究显示交感神经系统可对其原发生长和远处转移产生较大的影响[3-4]。副交感神经受体 M1(muscarinic acetylcholine M1 receptor,CHRM1)作为副交感神经系统胆碱能受体中最主要表达的受体亚型,已被证明在多种肿瘤尤其乳腺癌和胰腺癌中可调控癌症进展[6-7]。同时,CHRM1 在正常和癌变的前列腺中均有高度表达,刺激前列腺癌中的 CHRM1 可促进肿瘤进展,并且已有实验证明 CHRM1 可诱导前列腺癌的侵袭和转移[8-10]。

细胞焦亡是一种由 Caspase 家族诱导的炎症性细胞程序性死亡,近年逐渐被大家所关注。细胞焦亡可影响神经系统疾病、感染性疾病、自身免疫性疾病、心血管疾病等,并与多种肿瘤包括前列腺癌密切相关[11]。CHRM1 对于前列腺癌的调控过程中涉及多种细胞程序性死亡进程[8],但 CHRM1 与前列腺癌细胞焦亡的关系有待阐明。因此,本研究通过观察 CHRM1 对前列腺癌细胞焦亡的影响,探究其在前列腺癌发生、发展中的作用,为前列腺癌的靶向治疗提供新的思考方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

前列腺癌细胞株 PC-3 购自中国科学院细胞库,于课题组液氮罐中长期储存。胎牛血清购自以色列 BI 公司,DMEM/F12 购自美国 Gibco 公司,青霉素链霉素、0.25% 胰酶、嘌呤霉素、RIPA 裂解液、Hoechst-PI 双染试剂盒、LDH 释放检测试剂盒均购自北京碧云天公司;PMSF、DEPC 水、BSA、DMSO 购自北京索莱宝公司;PBS 粉末购自北京中杉金桥公司;PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶公司;细胞冻存液、通用型抗体稀释液购自苏州新赛美公司;PVDF 膜(0.22 μm)购自美国 Millipore 公司;CCK-8 购自江苏凯基生物公司;甘氨酸粉末、Tris-base 粉末购自美国 Amresco 公司;盐酸、无水乙醇购自重庆川东化工有限公司;氯贝胆碱(bethanechol,BETH)购自上海陶素公司,哌仑西平(pirenzepine,PIN)购自美国 MCE 公司;CHRM1 敲低病毒液及其对照、GSDMD 敲低质粒及对照购自上海吉凯基因化学技术有限公司,CHRM1、Caspase-1、ASC、cleaved Caspase-1、GSDMD、NLRP3 抗体购自美国 CST 公司,GAPDH 购自北京博奥森公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 使用 10% 胎牛血清以及 1% 青霉素链霉素双抗、DMEM/F12 培养液制成的培养基,在 37 ℃、5% CO_2 的状态下培养 PC-3 细胞。在生长良好的 PC-3 细胞中分别加入 200 μmol/L 最适浓度的 PIN 和 10 μmol/L 最适浓度的 BETH 处理 24 h,将其设置为 CTRL 组(DMSO)、PIN 组和 BETH 组;另外分别加入 0、100、200 μmol/L PIN 与 2、5、10 μmol/L BETH 处理 PC-3 细胞 24 h,设置 6 个实验组别。

1.2.2 慢病毒构建稳转细胞株及分组 把状态良好的 PC-3 细胞均匀铺在 12 孔板里,待细胞长到 40%~50% 时,更换无双抗培养基,按照说明书计算病毒滴度后均匀加入适量 CHRM1 敲低病毒及病毒增强液,轻轻摇匀,12~16 h 后更换为完全培养基,在荧光显微镜下密切关注感染荧光状况,待长满后可用胰酶消化传代,并添加适量浓度的嘌呤霉素以筛选带靶标的细胞。取生长良好的 sh-CHRM1 细胞进行实验,加入 10 μmol/L BETH 处理 24 h,设置为 NC 组(DMSO)、sh-CHRM1 组和 sh-CHRM1+BETH 组。

1.2.3 质粒转染及分组 待 PC-3 细胞在 24 孔板中贴壁生长至 80%~90% 时准备转染,转染前 24 h 更

换无双抗培养基,设置 si-GSDMD 敲低组与 si-NC 阴性对照组,按照 Lipofectamine™ 2000 使用说明书备好质粒 DNA 稀释液和转染试剂,将其混匀室温静置 20 min 后,加入每孔 100 μL 转染混合试剂,轻轻摇匀,培养 6 h 后更换为完全培养基,24 h 后再进行传代并用对应的抗生素进行筛选。取生长良好的 si-GSDMD 细胞进行实验,在 si-NC 细胞和 si-GSDMD 细胞里均加入 200 μmol/L PIN 处理 24 h,另在 si-NC 细胞中加入焦亡诱导剂 10 μmol/L LPS+5 mmol/L ATP 处理设置为焦亡阳性对照,设置 5 个组,分别为 NC 组、LPS 组、si-GSDMD 组、PIN 处理组和 si-GSDMD+PIN 处理组。

1.2.4　Western blot 检测　　将处理好的细胞置于冰上,加入适量 RIPA 蛋白裂解液(RIPA∶PMSF=100∶1),30 min 后用细胞刮刮至 2 mL EP 管中,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清液并用 BCA 法检测蛋白浓度,再 4∶1加入 5×上样 buffer,震荡混匀后 100 ℃煮 10 min,按照所需依次上样于配制凝好的 SDS-PAGE 凝胶泳道内,恒压 85 V 至溴酚蓝跑至底部,恒流 250 mA 冰浴转膜 1.5 h,用 5%脱脂牛奶浸泡转好的 PVDF 膜,室温下慢摇 2 h,一抗 4℃孵育过夜;次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min 后孵育对应二抗,室温下慢摇 1.5 h,再次洗膜后显影。使用 Image J 软件对灰度值进行分析,目的条带灰度值/GAPDH 内参灰度值表示结果。

1.2.5　CCK-8 检测细胞活力　　在 96 孔板中均匀铺好适量前列腺癌 PC-3 细胞,待细胞贴壁后分别于 12、24、48 h 使用 0、2、10、100、200、300 μmol/L CHRM1 特异性抑制剂 PIN 和 0、2、5、10、20、50 μmol/L M 受体激动剂 BETH 处理,24 h 后吸去培养基,每孔加入 100 μL CCK-8 液体,小心混匀避免气泡产生,37 ℃避光孵育 2 h 后使用酶标仪检测波长 460 nm 处光密度值[D(460)]。

1.2.6　LDH 释放试验　　将细胞按需接种于 96 孔板中,贴壁后将培养基更换为无血清培养基,设置好背景空白对照孔和未加药物的样品对照孔,加药处理后,于收样前 1 h 在设置的阳性对照孔中加入 LDH 释放试剂,到达设定时间后将所有孔液体吸至 EP 管中 400×g 离心 5 min,取上清液 120 μL 加入新的 96 孔板中,依次加入盒中 LDH 检测试剂,室温避光孵育 30 min 后在酶标仪检测波长 490 nm 处检测光密度值[D(490)]。

1.2.7　Annexin V-PI 流式细胞术　　将处理好的细胞的培养基分别收集在各离心管内,用胰酶消化贴壁细胞后 800 r/min 离心 5 min 后收集细胞沉淀,并用 PBS 洗涤重悬细胞继续离心,重复 2 次后用 500 μL PBS 重悬细胞后送流式房上机进行 Annexin V-PI 双染。

1.2.8　Hoechst-PI 双染　　将细胞均匀铺于 6 孔板中,按需处理 24 h 后吸去培养基,用 PBS 洗 3 次后,每孔加入 1 mL 细胞染色缓冲液、5 μL PI 染液、5 μL Hoechst 染液,轻轻混匀后,4 ℃避光孵育 30 min,吸去染液,PBS 洗后在荧光倒置显微镜下观察。

1.2.9　透射电镜观察细胞样本　　将处理好的细胞用胰酶消化后移至离心管 800 r/min 离心 5 min 后,用 1.5 mL 培养基重悬后转移至 2 mL EP 管中 1200 r/min 离心 10 min,小心吸去上清液,并沿管壁缓缓加入固定液,注意不要吹散细胞团块,将标本送电镜室制样后续透射电镜(日本电子透射电镜 JEM-1400Plus)下观察。

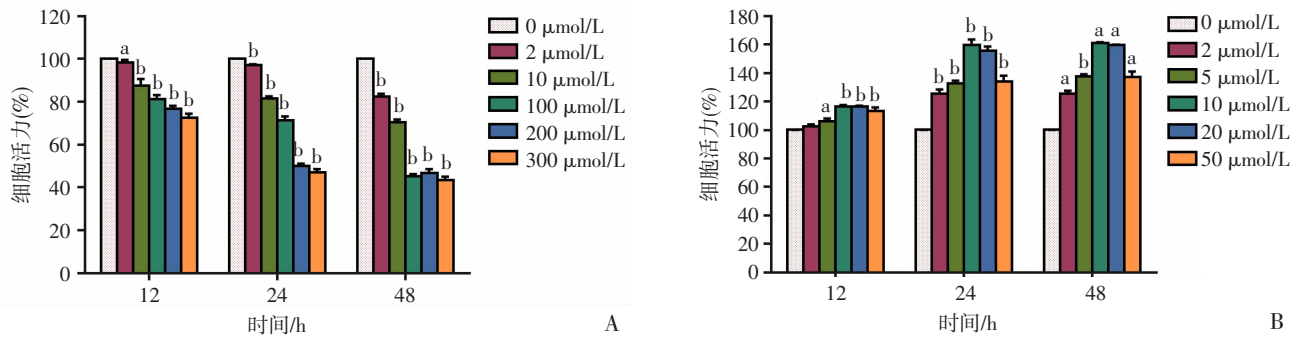
1.3　统计学分析

实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 9.0 对数据进行处理,多组均数比较采用方差分析,两组数据间差异采用非配对 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　抑制 CHRM1 可降低前列腺癌细胞活力

对不同时间、浓度 PIN 处理后的 PC-3 细胞进行 CCK-8 检测,发现细胞活力随 PIN 处理浓度增加而降低($P<0.05$,图 1A);相反,随 BETH 处理浓度增加,细胞活力在一定浓度范围内逐渐升高($P<0.05$,图 1B)。这说明抑制 CHRM1 可降低前列腺癌 PC-3 细胞活力,激动 CHRM1 可增加前列腺癌 PC-3 细胞活力。

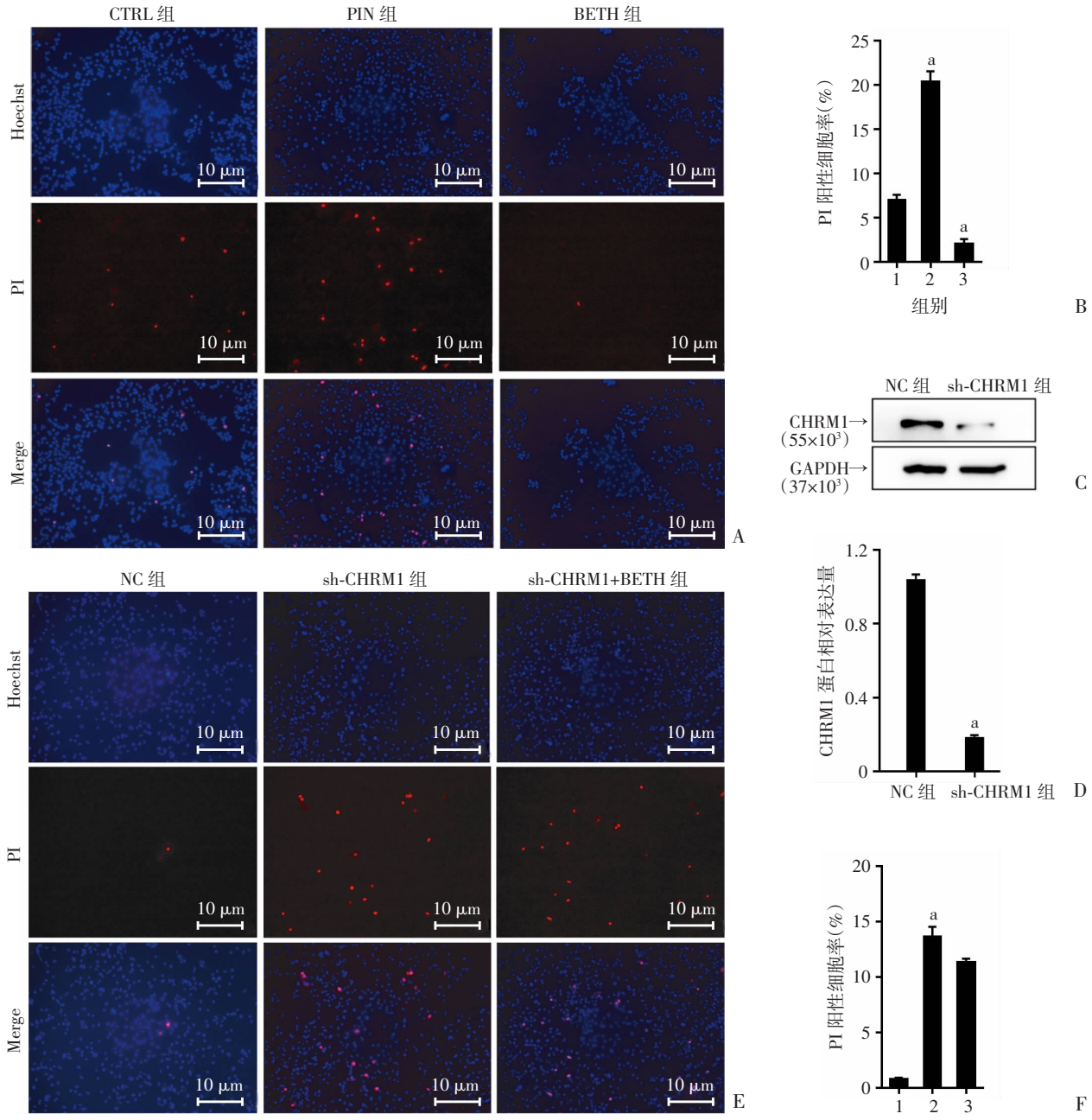


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组(0 μmol/L)比较;A:PIN 处理后 PC-3 的细胞活力;B:BETH 处理后 PC-3 的细胞活力

图 1　CCK-8 检测不同时间、不同浓度 CHRM1 抑制剂与激动剂对 PC-3 细胞活力的影响

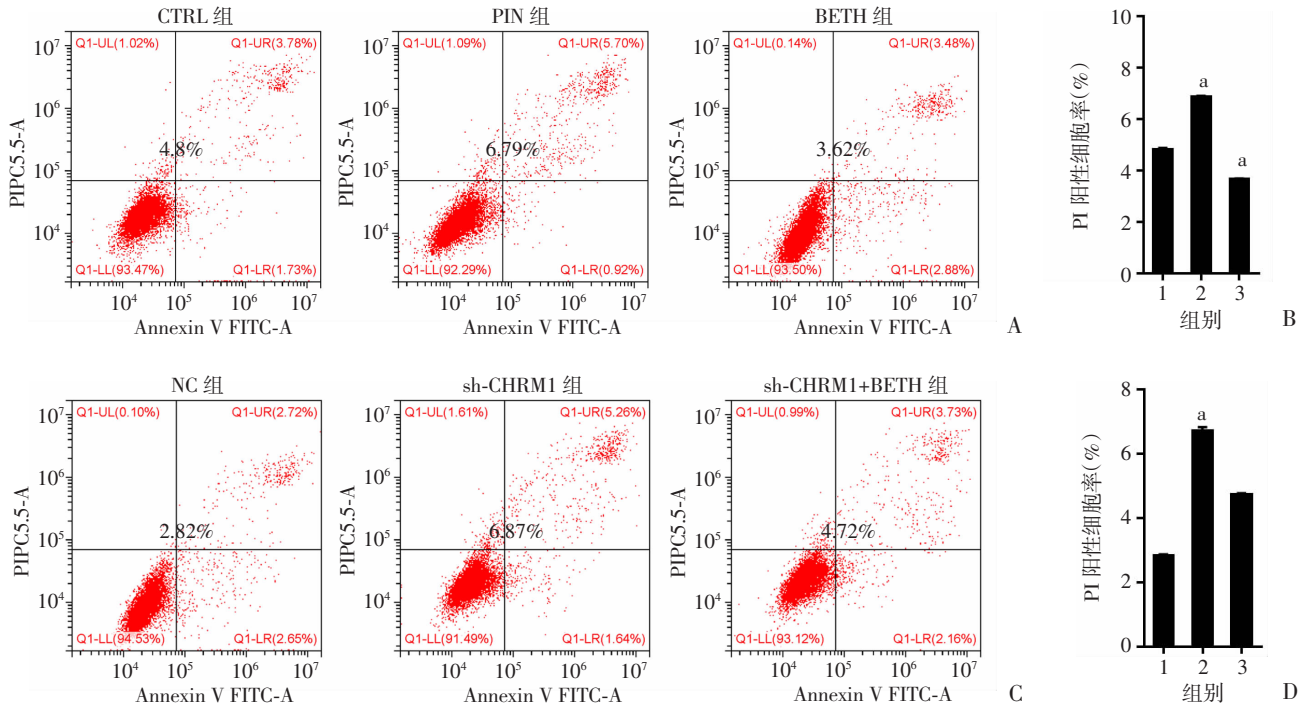
2.2　抑制 CHRM1 可提高 PI 阳性细胞率

通过慢病毒感染 PC-3 细胞构建 CHRM1 的稳定敲低细胞模型(图 2C、D)。对各组细胞进行 Hoechst-PI 双染以及流式细胞术染 Annexin V-PI 检测 PI 阳性细胞率,结果发现与 CTRL 组比较,PIN 组的 PI 阳性细胞率显著提升,而 BETH 组的 PI 阳性细胞率明显下降($P<0.01$,图 2A、B;图 3A、B);与 NC 组比较,sh-CHRM1 组的 PI 阳性细胞率也显著上升($P<0.01$,图 2E、F;图 3C、D)。结果提示我们抑制 CHRM1 可提高前列腺癌 PI 阳性细胞率。



a:$P<0.01$,与 CTRL 组或 NC 组比较;A、B:Hoechst-PI 双染 PC-3 细胞后检测 PI 阳性率及统计分析图　1:CTRL 组;2:PIN 组;3:BETH 组;C、D:Western blot 检测 CHRM1 敲低效率及蛋白半定量分析;E、F:Hoechst-PI 双染敲低 CHRM1 各组检测 PI 阳性率及统计分析图　1:NC 组;2:sh-CHRM1 组;3:sh-CHRM1+BETH 组

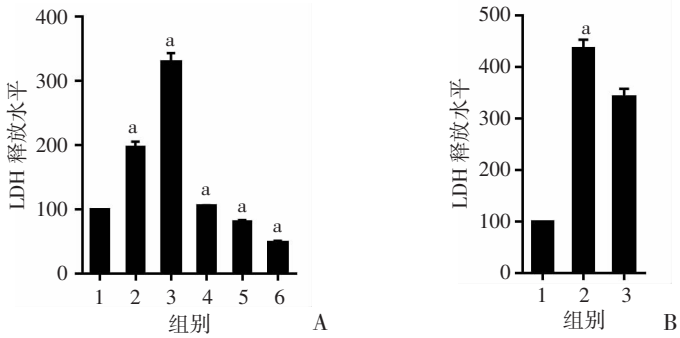
图 2　药物抑制 CHRM1 及敲低 CHRM1 后 Hoechst-PI 双染检测 PI 阳性细胞率



a: $P<0.01$,与 CTRL 组或 NC 组比较

A、B:加药处理组细胞 PI 阳性率及统计分析 1: CTRL 组;2:PIN 组;3:BETH 组;C、D:敲低组细胞 PI 阳性率及统计分析;1: NC 组;2:sh-CHRM1 组;3:sh-CHRM1+BETH 组

图 3 Annexin V-PI 流式细胞术检测抑制 CHRM1 后 PI 阳性细胞率



A: PC-3 细胞不同处理后 LDH 释放水平 1:对照组;2、3:分别为 100、200 μmol/L PIN 处理组;4~6:分别为 2、5、10 μmol/L BETH 处理组;a: $P<0.01$,与对照组比较;B:抑制 CHRM1 后细胞 LDH 释放水平分析 a: $P<0.01$,与 NC 组比较;1: NC 组;2:sh-CHRM1 组;3:sh-CHRM1+BETH 组

图 4 LDH 释放试验检测各组细胞 LDH 释放水平

2.3 抑制 CHRM1 可提高 LDH 释放水平

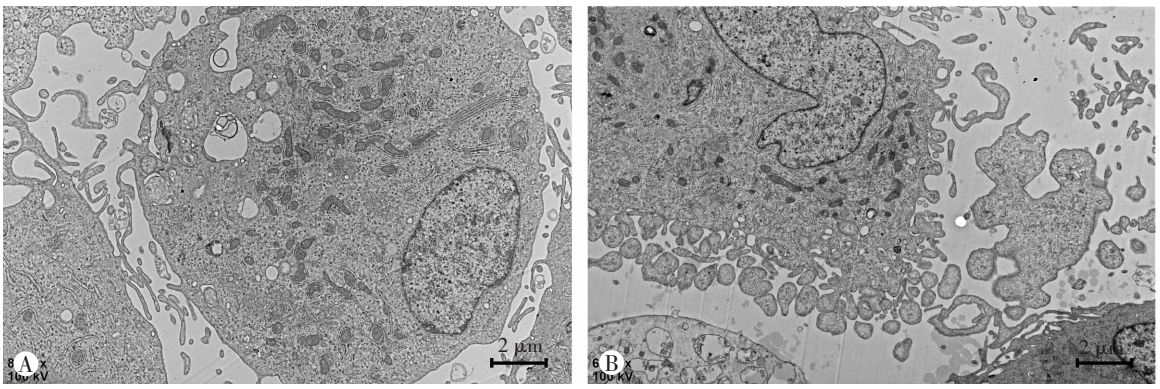
按需处理细胞 24 h 后,检测各组细胞 LDH 释放水平。结果提示 PIN 处理组细胞 LDH 释放水平显著增高,BETH 处理组 LDH 释放水平降低($P<0.01$,图 4A),sh-CHRM1 组 LDH 释放水平较 NC 组升高($P<0.01$,图 4B),提示抑制 CHRM1 可提高 LDH 释放水平。

2.4 抑制 CHRM1 可诱导细胞焦亡

将 PIN 处理的 PC-3 细胞收集起来在电镜下观察其形态,发现处理后的细胞内产生大量空泡,形成气泡状突起物,细胞膨大变形,发生明显的细胞焦亡现象(图 5),证实了在前列腺癌细胞中抑制 CHRM1 可诱导细胞焦亡的产生。

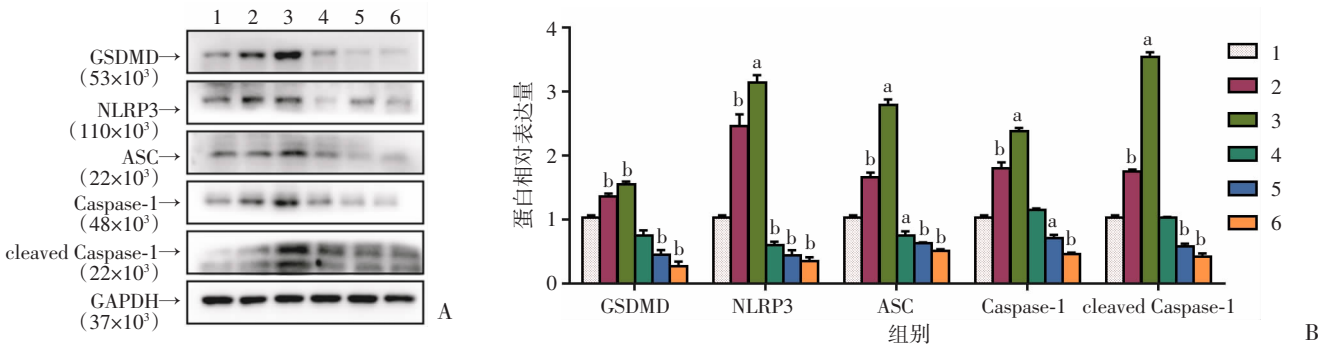
2.5　CHRM1 调控焦亡与 Caspase-1/GSDMD 通路相关

Western blot 检测各组 Caspase-1/GSDMD 通路相关的蛋白表达水平,发现随着 PIN 浓度增加,GSDMD、NLRP3、ASC、Caspase-1 以及 cleaved Caspase-1 的表达水平呈逐渐增加的趋势,而随着 BETH 浓度增加,以上蛋白水平呈逐渐降低趋势($P<0.05$,图 6)。而与 NC 组比较,sh-CHRM1 组的 Caspase-1/GSDMD 通路相关蛋白表达水平明显提高($P<0.01$,图 7),且有统计学意义,这说明了在前列腺癌细胞中下调 CHRM1 可抑制 Caspase-1/GSDMD 通路表达。



A: CTRL 组;B:PIN 组

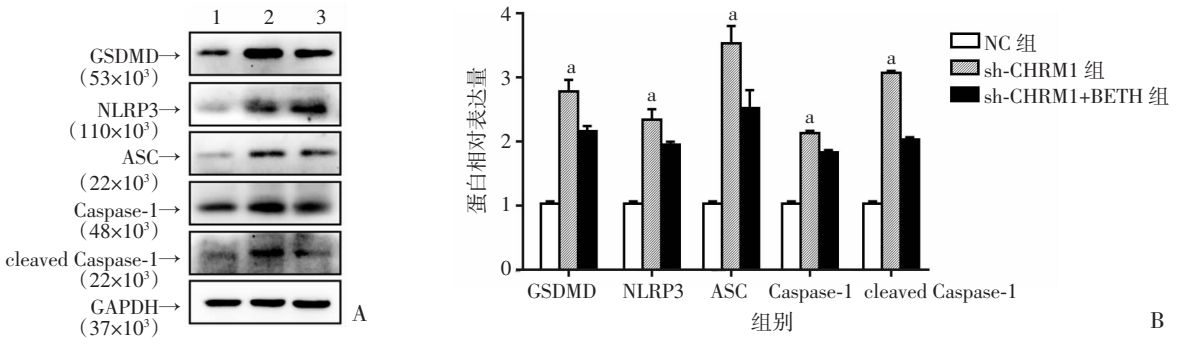
图 5　透射电镜检测下调 CHRM1 细胞焦亡现象



1:对照组;2、3:分别为 100、200 μmol/L PIN 处理组;4~6:分别为 2、5、10 μmol/L BETH 处理组;

A:各组细胞 Caspase-1/GSDMD 通路相关蛋白表达水平;B:各组蛋白表达半定量分析　a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与对照组比较

图 6　Western blot 检测 CHRM1 抑制剂、激动剂处理细胞后焦亡相关蛋白水平

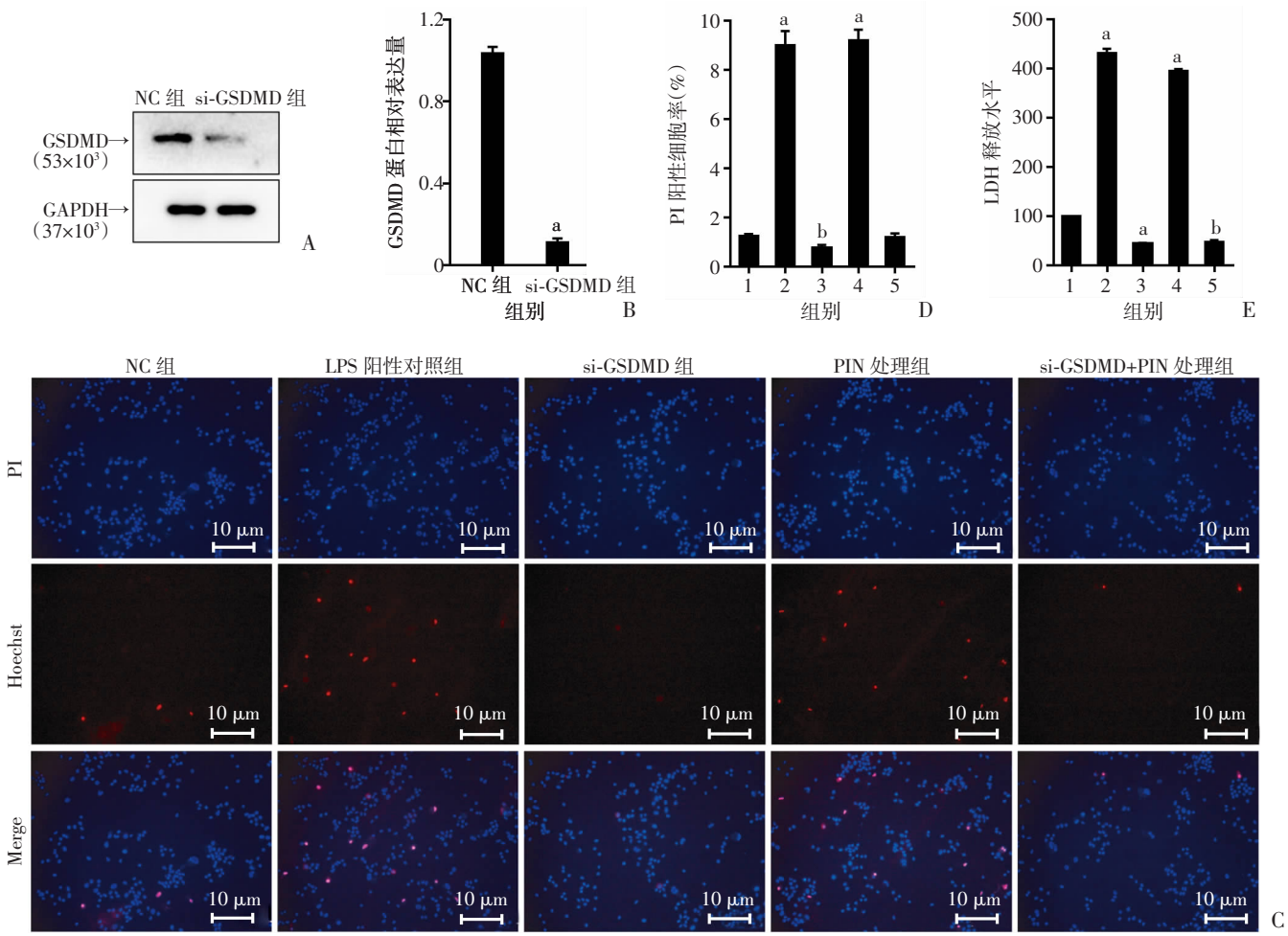


A:各组细胞 Caspase-1/GSDMD 通路相关蛋白表达水平; 1:NC 组;2:sh-CHRM1 组;3:sh-CHRM1+BETH 组;B:各组蛋白表达半定量分析, a: $P<0.01$,与 NC 组比较

图 7　Western blot 检测抑制 CHRM1 后细胞 Caspase-1/GSDMD 通路相关蛋白水平

2.6 CHRM1 通过 Caspase-1/GSDMD 通路调控焦亡

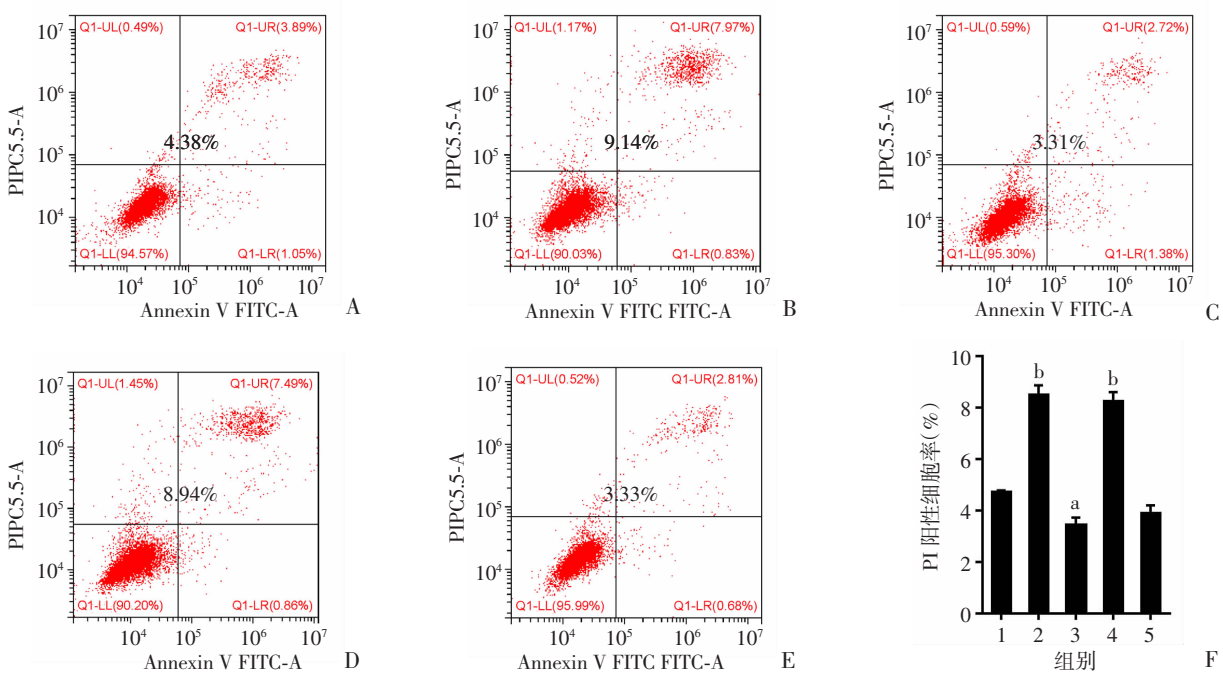
用质粒转染 PC-3 细胞,构建敲低 GSDMD 的细胞系(图 8A、B),通过 Hoechst-PI 双染实验(图 8C、D)、LDH 释放实验(图 8E)、流式细胞术 Annexin V-PI 染色(图 9)检测处理后各组 PI 阳性细胞率和 LDH 释放水平。与 NC 组比较,LPS 组和 PIN 处理组 PI 阳性细胞率、LDH 释放水平显著升高($P<0.01$),而 si-GSDMD 组的 PI 阳性细胞率、LDH 释放水平明显下调($P<0.05$),加入 CHRM1 特异性抑制剂 PIN 仍不能使水平回复,提示细胞中敲低 GSDMD 后,原本下调 CHRM1 诱导的细胞焦亡现象消失。同时,Western blot 检测结果(图 10)显示,与 NC 组比较,LPS 组和 PIN 处理组 GSDMD、NLRP3、ASC、Caspase-1、cleaved-Caspase-1 表达水平显著上升($P<0.01$),而 si-GSDMD 组相关蛋白表达水平明显下调($P<0.01$),且在 si-GSDMD 细胞中加入 PIN 处理并未使之有明显水平回复。这说明敲低 GSDMD 抑制了 CHRM1 所调控的细胞焦亡作用,提示下调 CHRM1 通过 GSDMD/Caspase-1 通路调控细胞焦亡。



1:NC 组;2:LPS 阳性对照组;3:si-GSDMD 组;4:PIN 处理组;5:si-GSDMD+PIN 处理组;

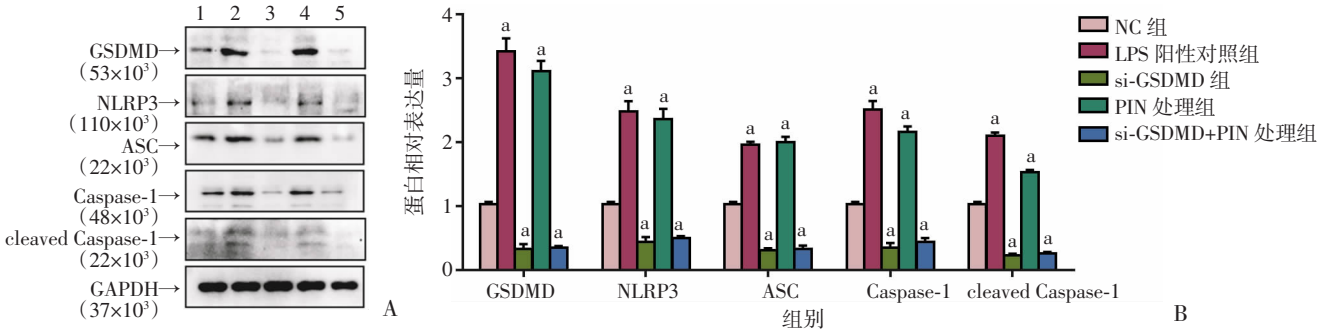
A、B:GSDMD 敲低效率的 Western blot 检测结果及蛋白半定量分析,a:$P<0.01$,与 NC 组比较;C:Hoechst-PI 双染处理各组细胞;D:PI 阳性细胞率统计分析,a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 NC 对照组比较;E:各组细胞 LDH 释放水平,a:$P<0.01$,与 NC 对照组比较

图 8 敲低 GSDMD 后 Hoechst-PI 染色检测各组 PI 阳性细胞率及 LDH 释放水平



A~E:依次为 NC 对照组、LPS 阳性对照组、si-GSDMD 组、PIN 处理组、si-GSDMD+PIN 组 PI 阳性细胞;F: PI 阳性细胞率分析,1:NC 组;2:LPS 组;3:si-GSDMD 组;4:PIN 处理组;5:si-GSDMD+PIN 处理组; a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与 NC 组比较

图 9 流式细胞术检测敲低 GSDMD 后各组 PI 阳性细胞率



A:各组细胞 GSDMD/Caspase-1 通路相关蛋白表达水平; 1:NC 组;2:LPS 阳性对照组;3:si-GSDMD 组;4:PIN 处理组;5:si-GSDMD+PIN 处理组;B:各组蛋白表达半定量分析; a: $P<0.01$,与 NC 组比较

图 10 Western blot 检测 si-GSDMD 组细胞 GSDMD/Caspase-1 通路相关蛋白水平

3 讨论

副交感神经受体与癌症的发生进展有着密不可分的联系,胆碱能受体依赖的信号通路在细胞增殖和癌症进展中发挥不可替代的作用,以胆碱能受体为靶点进行用药治疗的方式已经应用在各种疾病中[12]。已知存在 M1~M5 等多种胆碱能受体,而在正常前列腺组织和前列腺癌组织中最主要表达的为副交感神经 M1 受体[13]。在两种前列腺癌小鼠模型中,CHRM1 的缺陷显著抑制了胆碱能受体介导的前列腺癌侵袭和转移,提示 CHRM1 特异性的拮抗剂或可指导临床对肿瘤的治疗[12]。由此,本研究选择 CHRM1 特异性抑制剂哌仑西平和激动剂氯贝胆碱处理 PC-3 细胞,通过 CCK-8 检测其细胞活力,确定了抑制 CHRM1 可使前列腺癌 PC-3 细胞增殖能力在一定范围内呈时间和浓度依赖性降低,激活 CHRM1 使其在一定范围内呈时间和浓度依赖性增加。这提示抑制 CHRM1 可抑制前列腺癌细胞增殖能力。

细胞死亡作为一种正常的细胞生理进程,能通过去除受损细胞以及清理无用的细胞器来保持细胞的自我更新和维持生命力,在肿瘤环境的调节中尤其重要[14-15]。而细胞焦亡是近几年重点研究的程序性细

胞死亡方式,越来越多的证据证明细胞焦亡在多种肿瘤发生发展中起到关键作用[16]。区别于传统的死亡方式,细胞焦亡的本质是细胞的一种炎性坏死。它是由活化的特异性半胱天冬蛋白酶切割 Gasdermin 家族,从而在胞膜上打孔以致细胞肿胀破裂、炎性物质流出导致细胞死亡的过程,常伴胞内大量 LDH 释放。本研究通过 LDH 释放实验检测发现下调 CHRM1 可显著提高 PC-3 细胞的 LDH 释放率,提示 CHRM1 可能影响前列腺癌细胞焦亡水平;通过 Hoechst-PI 双染、Annexin V-PI 流式细胞术检测发现下调 CHRM1 后 PI 阳性细胞率较对照组显著提升,使用激动剂激动 CHRM1 后 PI 阳性率明显下降;且通过透射电镜观测下调 CHRM1 后的前列腺癌 PC-3 细胞,发现明显细胞焦亡现象。由此说明 CHRM1 可以负向调控前列腺癌焦亡水平。

截至目前,人们发现细胞焦亡可通过多种通路实现,其一是经典途径 Caspase-1/GSDMD 通路,其二是非经典途径,可通过 Caspase-4、Caspase-5、Caspase-11 等通路,其三是 Caspase-3/Caspase-8 介导的通路等等[17]。有研究发现前列腺结节在完全转化为前列腺肿瘤之后,机体内的肿瘤细胞焦亡机制在一定刺激下会被启动[18],且在前列腺癌细胞焦亡现象中有检测到 Caspase-1 通路的激活[19],但具体调节的机制仍不明朗。其中,Caspase-1/GSDMD 通路诱导的焦亡是由炎症小体组装介导的,伴随着 GSDMD 的裂解和 IL-1β、IL-18 的释放。炎症小体是多分子复合物,当外界环境改变时可被激活,其中,NLRP3 也称为炎症小体传感器,可与前体 Caspase-1 以及 ASC 组装成典型的炎症小体完成后续的细胞反应[20]。为了探索 CHRM1 诱导的前列腺癌细胞焦亡是否与此通路相关,本研究通过 Western blot 检测 Caspase-1/GSDMD 通路相关的分子 GSDMD、NLRP3、ASC、Caspase-1、cleaved-Caspase-1 的表达,发现下调 CHRM1 后,以上分子蛋白水平显著上调;激动剂处理后,以上分子蛋白水平明显降低,提示抑制或敲低 CHRM1 后 Caspase-1/GSDMD 通路可被激活。

为了明确 CHRM1 是否通过 Caspase-1/GSDMD 通路诱导前列腺癌细胞焦亡从而调控前列腺癌发展,本实验通过质粒转染敲低 PC-3 细胞中的 GSDMD,并设置各对照组及实验组,再次通过 Hoechst-PI 双染、Annexin V-PI 流式细胞术、LDH 释放实验以及 Western blot 检测 Caspase-1/GSDMD 通路蛋白表达水平,发现敲低组各种相关指标水平的差异性表达非常显著,且敲低 GSDMD 后再抑制 CHRM1 无法再激活前列腺癌细胞焦亡。这有效证明 CHRM1 是通过调控 Caspase-1/GSDMD 通路实现前列腺癌细胞焦亡过程。

目前 CHRM1 抑制剂对于前列腺癌治疗作用的探索还处于基础研究阶段,仍需要进一步的体内实验及临床研究验证。本研究发现 CHRM1 能够通过 Caspase-1/GSDMD 通路负向调控前列腺癌细胞焦亡影响前列腺癌发展过程,有望为预防和治疗前列腺癌提供新的研究思路。

参考文献:

[1] 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.

[2] YANG Y Y, LIU K Y, LIU Q, *et al*. Androgen receptor-related non-coding RNAs in prostate cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 660853. DOI: 10.3389/fcell.2021.660853.

[3] MAGNON C, HALL S J, LIN J, *et al*. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression[J]. Science, 2013, 341(6142): 1236361. DOI: 10.1126/science.1236361.

[4] PENNEFATHER J N, LAU W A, MITCHELSON F, *et al*. The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies[J]. J Auton Pharmacol, 2000, 20(4): 193-206. DOI: 10.1046/j.1365-2680.2000.00195.x.

[5] 张咪,王千慧,陈津滢,等.交感神经 β2 肾上腺素受体促进前列腺癌转移并抵抗肿瘤细胞的凋亡[J].第三军医大学学报, 2019, 41(21): 2051-2060. DOI:10.16016/j.1000-5404.201906119.
ZHANG M, WANG Q H, CHEN J Y, *et al*. Sympathetic β2 adrenergic receptor promotes prostate cancer metastasis and resists tumor cell apoptosis[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(21): 2051-2060. DOI:10.16016/j.1000-5404.201906119.

[6] BAIG A M, IQBAL J, KHAN N A. *In vitro* efficacies of clinically available drugs against growth and viability of an Acanthamoeba castellanii keratitis isolate belonging to the T4 genotype[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(8): 3561-3567. DOI: 10.1128/AAC.00299-13.

[7] ESPAÑOL A J, DE LA TORRE E, FISZMAN G L, *et al*. Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression[J]. Life Sci, 2007, 80(24/25): 2281-2285. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.12.017.

[8] KAMIYA A, HIYAMA T, FUJIMURA A, *et al*. Sympathetic and parasympathetic innervation in cancer: therapeutic implications[J]. Clin Auton Res, 2021, 31(2): 165-178. DOI: 10.1007/s10286-020-00724-y.

[9] KAMIYA A, HAYAMA Y, KATO S, *et al*. Genetic manipulation of autonomic nerve fiber innervation and activity and its effect on breast cancer progression[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(8): 1289-1305. DOI: 10.1038/s41593-019-0430-3.

[10] COLE S W, NAGARAJA A S, LUTGENDORF S K, *et al*. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(9): 563-572. DOI: 10.1038/nrc3978.

[11] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1106-1121. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.

[12] KRUSE A C, KOBILKA B K, GAUTAM D, *et al*. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(7): 549-560. DOI: 10.1038/nrd4295.

[13] WITTE L P, TEITSMA C A, DE LA ROSETTE J J, *et al*. Muscarinic receptor subtype mRNA expression in the human prostate: association with age, pathological diagnosis, prostate size, or potentially interfering medications?[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2014, 387(2): 207-214. DOI: 10.1007/s00210-013-0934-4.

[14] DEGTEREV A, YUAN J Y. Expansion and evolution of cell death programmes[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(5): 378-390. DOI: 10.1038/nrm2393.

[15] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 678-695. DOI: 10.1038/s41580-020-0270-8.

[16] YU P, ZHANG X, LIU N, *et al*. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5.

[17] 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. DOI: 10.1038/s41419-019-1883-8.

[18] BERGSTRÖM S H, JÄREMO H, NILSSON M, *et al*. Prostate tumors downregulate microseminoprotein-beta (MSMB) in the surrounding benign prostate epithelium and this response is associated with tumor aggressiveness[J]. Prostate, 2018, 78(4): 257-265. DOI: 10.1002/pros.23466.

[19] KARAN D, TAWFIK O, DUBEY S. Expression analysis of inflammasome sensors and implication of NLRP12 inflammasome in prostate cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 4378. DOI: 10.1038/s41598-017-04286-4.

[20] FISCHER F A, CHEN K W, BEZBRADICA J S. Posttranslational andtherapeutic control of gasdermin-mediated pyroptosis and inflammation[J]. Front Immunol, 2021, 12: 661162. DOI: 10.3389/fimmu.2021.661162.

(收稿:2021-05-06;修回:2021-07-16)

(编辑 汪勤俭)