DOI:10.16016/j.2097-0927.202202151

双氢青蒿素诱导前列腺癌细胞焦亡及调控凋亡相关斑点样蛋白甲基化

周驷杰,刘思豪,杨嘉昕,黄燕萍,夏 憧,罗子国 400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院

[摘要] **目的** 探讨双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)诱导前列腺癌(prostate cancer,PCa)细胞焦亡及其可能的机制。**方法** 将 PC-3 与 DU145 细胞分为对照组与药物组(50 μmol/L DHA)。采用 CCK-8 检测 DHA 作用前列腺癌 PC-3 以及 DU145 细胞的增殖情况;电镜观察细胞焦亡现象;Caspase-1 比色检测和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)释放检测验证细胞膜完整性;ELISA 法检测 IL-18 和 IL-1β 表达水平;Annexin V-PI 双染流式细胞术测定细胞焦亡量。生物信息学分析寻找正常前列腺细胞与 PCa 细胞的表达差异基因。选用地西他滨(decitabine,DAC,2 μmol/L)作为阳性对照,亚硫酸氢盐测序法检测凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,*ASC*)的甲基化状态。RT-qPCR 及蛋白免疫印迹法检测焦亡相关蛋白的表达情况。构建 PC-3 裸鼠种植瘤模型,分为对照组与药物组(50 μmol/L DHA),对比肿瘤生长状况。蛋白免疫印迹法检测组织蛋白以及透射电镜验证体外实验的实验结果。**结果** CCK-8 结果显示 DHA 明显抑制 PC-3 以及 DU145 细胞增殖($P<0.01$)。透射电镜和扫描电镜均观察到药物组细胞焦亡形态学改变。与对照组比较,药物组细胞外 Caspase-1、LDH 明显升高($P<0.01$),显示细胞膜完整性缺失;炎症因子 IL-18 和 IL-1β 水平升高($P<0.01$),提示产生焦亡。Annexin V-PI 双染流式细胞术显示药物组 PI^+ 细胞定量较对照组增多($P<0.01$)。生物信息学分析显示 *ASC* 在 PCa 中表达明显受限;DHA 对抑癌基因 *ASC* 的去甲基化效果明显优于 DAC($P<0.01$)。实时荧光定量 PCR 以及蛋白免疫印迹法检测结果表明 DHA 明显上调焦亡通路中黑色素瘤缺乏因子 2(*AIM2*)、*ASC*、*Caspase*-1、*Gasdermin D*(*GSDMD*)和 *GSDMD-N* 端的表达水平。PC-3 裸鼠种植瘤药物组肿瘤体积明显小于对照组($P<0.01$),目的蛋白的表达上调情况及透射电镜观察肿瘤组织发生细胞焦亡形态学改变均与体外实验一致。**结论** DHA 能抑制 PCa 细胞增殖,恢复焦亡相关基因表达以及恢复抑癌基因 ASC 的甲基化状态,诱导细胞焦亡。

[关键词] 双氢青蒿素;细胞焦亡;甲基化;前列腺癌

[中图法分类号] R282.71; R285.5; R737.25 [文献标志码] A

Dihydroartemisinin induces pyroptosis and regulates apoptosis-associated speck-like protein methylation in prostate cancer cells

ZHOU Sijie, LIU Sihao, YANG Jiaxin, HUANG Yanping, XIA Tong, LUO Ziguo Institue of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of dihydroartemisinin (DHA) on pyroptosis in prostate cancer (PCa) cells and the underlying possible mechanism. **Methods** PCa cell lines PC-3 and DU145 were divided into control group and DHA treatment group (50 μmol/L DHA). Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the cell proliferation in the PC-3 and DU145 cells with and without DHA treatment. Pyroptosis was observed by electron microscopy. The integrity of cell membrane was detected by Caspase-1 activity and lactate dehydrogenase (LDH) release. The contents of interleukin (IL)-18 and IL-1β

[通信作者] 罗子国,E-mail:luoziguo@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 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/)

were detected by ELISA. Annexin V-PI double-staining flow cytometry was used to measure pyroptosis. Bioinformatics analysis were performed to seek out the differentially expressed genes between normal prostate cells and PCa cells. Decitabine (DAC, 2 μmol/L) was used as a compared agent, the methylation level of apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (*ASC*) was detected by bisulfite sequencing PCR. The mRNA and protein levels of pyroptosis-related molecules were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting respectively. After xenograft nude mice were established with PC-3 cells, the tumor growth were observed in the mice with and without treatment of 50 μmol/L DHA. Western blotting and transmission electron microscopy were performed to verify the results. **Results** CCK-8 assay showed that DHA significantly inhibited the proliferative activity of PC-3 and DU145 cells ($P<0.01$). Both transmission and scanning electron microscope indicated the morphology of pyroptosis. The extracellular contents of Caspase-1 and LDH were significantly higher in the treatment group than the control group ($P<0.01$), indicating loss of cell membrane integrity. Elevated levels of IL-18 and IL-1β suggested pyroptosis. Annexin V-PI double-staining flow cytometry showed there were larger number of PI^+ cells in the treatment group than the control group ($P<0.01$). Bioinformatics analysis indicated that *ASC* was the differentially expressed gene. DHA showed better demethylation effect on tumor suppressor gene *ASC* than DAC ($P<0.01$). Quantitative real-time PCR and Western blotting indicated that DHA up-regulated the mRNA and protein levels of the genes related to pyroptosis, including absent in melanoma 2 (*AIM2*), *ASC*, *Caspase*-1, *Gasdermin D* (*GSDMD*) and *GSDMD-N*. Xenograft tumors in the treatment groups were obviously smaller than those in the control groups ($P<0.01$). The up-regulation of target proteins and the morphology of pyroptosis under transmission electron microscope *in vivo* were consistency with the results *in vitro*. **Conclusion** DHA inhibits the proliferation of PCa cells. Up-regulation of pyroptosis related genes and restoring the methylation level of tumor suppressor gene *ASC* can induce pyroptosis.

[**Key words**] dihydroartemisinin; pyroptosis; methylation; prostate cancer

Corresponding author: LUO Ziguo, E-mail: luoziguo@cqmu.edu.cn

前列腺癌(prostate cancer,PCa)作为危害男性健康的常见恶性肿瘤之一,近年来其发病率及病死率逐年上升,跃居为第二大全球男性癌症相关性死亡原因[1-4]。晚期PCa易进展为非雄激素依赖性PCa,这将使传统的手术治疗和去势治疗无效[5-6]。因此,寻找低毒高效的抗肿瘤药物以应对非雄激素依赖性PCa极为迫切。

双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)是一种从青蒿素中提取的有效抗疟疾药物,近年来,针对其潜在的抗肿瘤作用研究取得进展[7-9],相关机制与细胞程序性死亡有关[10-11]。细胞程序性死亡包括细胞凋亡、焦亡等[12-14]。国外及本课题组前期研究结果显示:DHA虽然可以通过上调促凋亡基因以及下调抗凋亡基因的表达诱导细胞凋亡以达到抗肿瘤的目的[15-16],但低剂量的DHA抗肿瘤作用更偏向于抑制细胞增殖,而诱导细胞凋亡的作用有限,提示在诱导细胞凋亡外可能还有其他的抗肿瘤途径[17]。在前期的体内实验中,我们发现DHA也能诱导细胞发生焦亡现象,但其相关机制不清,这为PCa中DHA的抗肿瘤作用研究提供了一个新的方向。

细胞焦亡是一种由Gasdermin蛋白家族介导的高度促炎性、程序性坏死的细胞死亡形式。目前的研究发现,依赖于Caspase-1/Gasdermin D(GSDMD)的焦亡经典途径与肿瘤的发生、发展关系密切[18],经典途径在非雄激素依赖性PCa中起主导作用[19]。在经典途径中,抑癌基因凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,*ASC*)与上游黑色素瘤缺乏因子2(absent in melanoma 2,*AIM2*)特异性结合为炎性复合体,是激活下游*Caspase*-1和*GSDMD*诱导细胞焦亡的关键[20-22]。结合前期研究发现,抑癌基因*ASC*的表达受表观遗传学机制的调控,PCa中高甲基化状态导致*ASC*的表达沉默[23-24],*ASC*的沉默失活是导致肿瘤发生和癌细胞增殖的重要因素[25]。因此,本研究旨在探讨DHA调控*ASC*的甲基化状态以及上下游目的基因的表达,从而诱导PCa细胞发生细胞焦亡,以期为DHA抗肿瘤机制研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

胎牛血清、DMEM/F12、glutaMAX 添加剂购自美国 Gibco 公司;DHA、DAC 和二甲基亚砜(DMSO)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;兔抗 ASC、兔抗 AIM2 和兔抗 Caspase-1 和兔抗 GSDMD 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗 β-肌动蛋白多克隆抗体来自中国北京博奥森公司,辣根过氧化物酶偶联二抗[抗兔免疫球蛋白 G(IgG)抗体]购自北京 ZSGB-BIO OriGene 公司;CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒、PRIPA 裂解液,SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒,BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Caspase-1 比色检测试剂盒、乳酸脱氢酶释放检测试剂盒、IL-18 ELISA 检测试剂盒和 IL-1β ELISA 检测试剂盒购自中国碧云天生物技术公司;DNeasy 提取试剂盒购于美国 Qiagen 公司;SYBR 酶、反转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;抗体稀释液购自中国新赛美公司;甲基化检测试剂盒购自英国 Abcam 公司。

荧光光谱仪(F-7000)购于日本日立高科技公司;实时荧光定量 PCR 仪、4 ℃离心机、ChemiDox XRs 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;透射电子显微镜购自日本 JEOL JEM-1400 PLUS 公司,扫描电子显微镜购自日本 HITACHI SU8010 公司。

1.2 细胞培养与药物干预

人 PCa 细胞 PC-3、DU145 均购自中国科学院上海细胞库。DMEM/F12 混以 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、2 mmol/L glutaMAX 配置培养基于 37 ℃、5% CO_2、95%湿度孵育,每 3 天传代 1 次。

将 DHA 溶于 DMSO 溶剂制备为 0.1 mmol/L 的母液,4 ℃保存,0.22 μm 过滤器过滤后使用。将 DAC 溶于 DMSO 溶剂制备为 0.1 mmol/L 的母液,-20 ℃保存以备使用。将 PC-3 和 DU145 细胞分为对照组与药物组。将细胞按 5×10^3/孔接种于 96 孔板,每组 6 个重复孔,培养 48 h 待细胞生长至 80%,加入 DHA 和 DAC 处理 48 h。测定 3 h 前,每组更换混合 10 μL CCK-8 试剂的 100 μL 培养基。用荧光光谱仪(F-7000)测定 450 nm 波长下的光密度值[$D(450)$]。按公式计算抑制率和存活率:抑制率=[$D(450)_{药物组}-D(450)_{对照组}$]/[$D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}$],存活率=[$D(450)_{药物组}-D(450)_{空白组}$]/[$D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}$]。

1.3 裸鼠成瘤实验

选择 4~6 周龄雄性裸鼠(购自重庆医科大学实验动物中心,编号为 110011210104105881)作为成瘤对象,裸鼠品系为 BALB/c Nude,均为 SPF 级,许可证号:SCXK(京)2016-0006。按照对照组及药物组划分为各组 6 只。将 PC-3 细胞(约 5×10^6/mL)重悬于 PBS 中,经皮穿刺将 0.1 mL 细胞悬液接种于裸鼠右大腿附近的下背部,饲养 14 d,待肿瘤直径达到 0.5 cm×0.6 cm。选择相同体质量和肿瘤质量的裸鼠进行药物干预,随机分为对照组和药物组,每组 4 只。对照组注射 DMSO,药物组以 DHA(50 μmol/L)每隔 1 天注射 1 次,第 13 天收集肿瘤。通过肿瘤体积测定,观察 DHA 对肿瘤的抑制效率。并将肿瘤组织用于后续蛋白免疫印迹检测以及电镜观察。

1.4 电镜观察

1.4.1 透射电镜 对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。从细胞中收集的样品,1 000 r/min 离心 10 min 形成团块。去除上清液,沿管壁加入戊二醛固定剂。4 ℃保存,后期置于电镜下观察。体内实验中,用眼科剪分离 1.3 中对照组与药物组的肿瘤组织,4%戊二醛固定 4 h,1% OsO_4 固定 2 h。然后将肿瘤脱水、包埋、超薄切片,置于电镜下观察。

1.4.2 扫描电镜 对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。细胞标本 1 000 r/min 离心 10 min,PBS 洗涤 2 次,去除上清液。将 1.5 μL 细胞悬液加在喷有铂金的载玻片上,静置 1 h。然后将载玻片放入戊二醛固定 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 7 min。然后依次用梯度浓度乙醇(30%、50%、70%、90%和无水乙醇)和叔丁醇(30%、50%、70%、90%和无水叔丁醇)进行脱水。最后将载玻片冷藏 30 min,抽真空后用扫描电子显微镜进行观察。

1.5 Caspase-1 比色检测、乳酸脱氢酶释放检测实验

细胞焦亡过程中细胞膜破裂会导致细胞外 Caspase-1 含量增加,LDH 释放到细胞膜外。采用 Caspase-1 比色法和 LDH 释放实验检测 PC-3 和 DU145 细胞膜的完整性。

1.5.1 Caspase-1 比色检测 对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。将细胞以 250×g 离心 10 min,用 Caspase-1 比色检测试剂盒中 25 μL 裂解液冷孵育 10 min,再 10 000×g 离心 1 min。将上清液移至 96 孔板,每组 3 孔重复。加入 50 μL 细胞裂解液处理后,每个反应孔加入 5 μL 的 Caspase-1 标准品,37 ℃条件下静置 1.5 h。用荧光光谱仪测定 450 nm 处的光密度值[$D(450)$]。活性比=[$D(450)_{药物组}-D(450)_{空白组}$]/[$D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}$]。

1.5.2 LDH 释放实验 对照组待细胞生长至 80%

时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。采用 LDH 细胞毒性测定试剂盒检测细胞膜破裂后的含量释放程度。将样品种于 96 孔板上(每孔加入 100 μL 细胞悬液)。待细胞生长 2 d 后,每孔加入 10 μL 细胞裂解液和 100 μL LDH 反应液,室温孵育 30 min。用荧光光谱仪测定 600 nm 处的光密度值[$D(600)$]。释放比=[$D(600)_{药物组}-D(600)_{空白组}$]/[$D(600)_{对照组}-D(600)_{空白组}$]。

1.6 ELISA 法检测 IL-18、IL-1β 释放量

采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay,ELISA)法检测 IL-18、IL-1β 释放量以验证 PC-3 和 DU145 细胞膜的完整性。对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。800 r/min 离心 5 min 后将细胞悬液接种于 96 孔板内,100 μL/孔,室温静置 2 h。弃上清洗板 2 次后加入 100 μL 生物素化抗体,室温静置 1 h。弃上清洗板 2 次后加入 100 μL Streptavidin,避光孵育 30 min。弃上清洗板 2 次后加入 100 μL 显色剂,避光孵育 30 min。加入终止液 50 μL 后用荧光光谱仪测定 450 nm 处的光密度值[$D(450)$]。计算 IL-18、IL-1β 的相对表达量。

1.7 Annexin V-PI 流式细胞术

将 PC-3 和 DU145 细胞分别分为对照组、药物组,共 4 组。对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。用胰酶消化离心(800 r/min,5 min)后移至 1.5 μL 的微型离心管内并添加 PBS 重悬,送至重庆医科大学生命科学研究院进行细胞定量检测。

1.8 亚硫酸氢盐基因组测序 PCR

将 PC-3 和 DU145 细胞分别分为对照组、阳性对照组(DAC 2 μmol/L)和药物组(DHA 50 μmol/L),共 6 组。对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时分别予以 2 μmol/L DAC 和 50 μmol/L DHA 培养 48 h。使用 DNeasy 提取试剂盒从 PC-3 和 DU145 细胞中提取基因组 DNA。对亚硫酸氢盐修饰的 DNA 样本进行亚硫酸氢盐基因组测序,使用针对 *ASC* 启动子中 CpG 富集区的引物集来观察其甲基化状态。引物序列:ASC 上游 5′-GGGATTA-AGGGTGTAGTAAGGAAG-3′,下游 5′-CCAACTTAT-CRATAAAATCCAAAAC-3′。亚硫酸氢盐基因组测序在含有 Go*Taq* 混合物的反应溶液中进行 40 个循环(94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s)。在 2%的琼脂糖凝胶中进行 PCR 分析。将 PCR 产物连接至 pTG19-T 载体进行测序。

1.9 实时荧光定量 PCR

对照组细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。提取细胞 RNA 用由 PrimeScript™ RT 试剂试剂盒与 gDNA Eraser 进行反转录。引物序列如下:β-actin 上游 5′-CGGCACCACCATGTACCCT-3′,下游 5′-ACACG-GAGTACTTGCGCTCAG-3′;ASC 上游 5′-TGACGGATG-AGCAGTACCA-3′,下游 5′-GGCCTGGAGGAGCAAGT-3′;AIM2 上游 5′-CGTTTGAGACCCAAGAAGGC-3′,下游 5′-ACGTGAGGCGCTATTTACCT-3′);Caspase-1 上游 5′-ACAGGCATGACAATGCTGCT-3′,下游 5′-GCTGTC-AGAGGTCTTGTGCT-3′;GSDMD 上游 5′-GTGCTTGCA-GGGTGAGG-3′,下游 5′-GCTCGTGGAACGCTTGT-3′。扩增的反应条件为:95℃反应 30 s,90℃反应 5 s,57 ℃反应 30 s,循环 39 次,最后 65℃反应 30 s。数据采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。重复 3 次。

1.10 蛋白免疫印迹法

1.10.1 体外实验

检测焦亡相关蛋白 *AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD*、*GSDMD-N* 时,对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时予以 50 μmol/L DHA 培养 48 h。检测抑癌基因 ASC 的蛋白表达情况时,对照组待细胞生长至 80%时继续培育 48 h,药物组待细胞生长至 80%时分别予以 2 μmol/L DAC 和 50 μmol/L DHA 培养 48 h。从细胞中收集总蛋白,采用 BCA 蛋白增强检测试剂盒检测蛋白浓度,加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,用 SDS 装载缓冲液煮沸 10 min。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(12%凝胶)。随后,将分离的蛋白质电转移至 PVDF 膜。用含有 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭,分别用以下抗体在 4 ℃中孵育过夜:兔抗 AIM2、ASC、Caspase-1、GSDMD (1∶1 000)和兔抗 β-actin (1∶1 000)。过夜后用 TBST 洗涤 3 次,用二抗(1∶20 000)在室温下孵育 1 h,再用 TBST 洗涤 3 次。特异性蛋白通过 ChemiDoc XRS 成像系统进行显影。重复 3 次。

1.10.2 体内实验

分别提取 1.3 中对照组与药物组的肿瘤组织总蛋白。加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液,冰下超声破碎和涡旋振荡 5 min 共 6 次,4 ℃下 12 000 r/min 离心 20 min。后续步骤与体外实验相同。重复 3 次。

1.11 数据分析

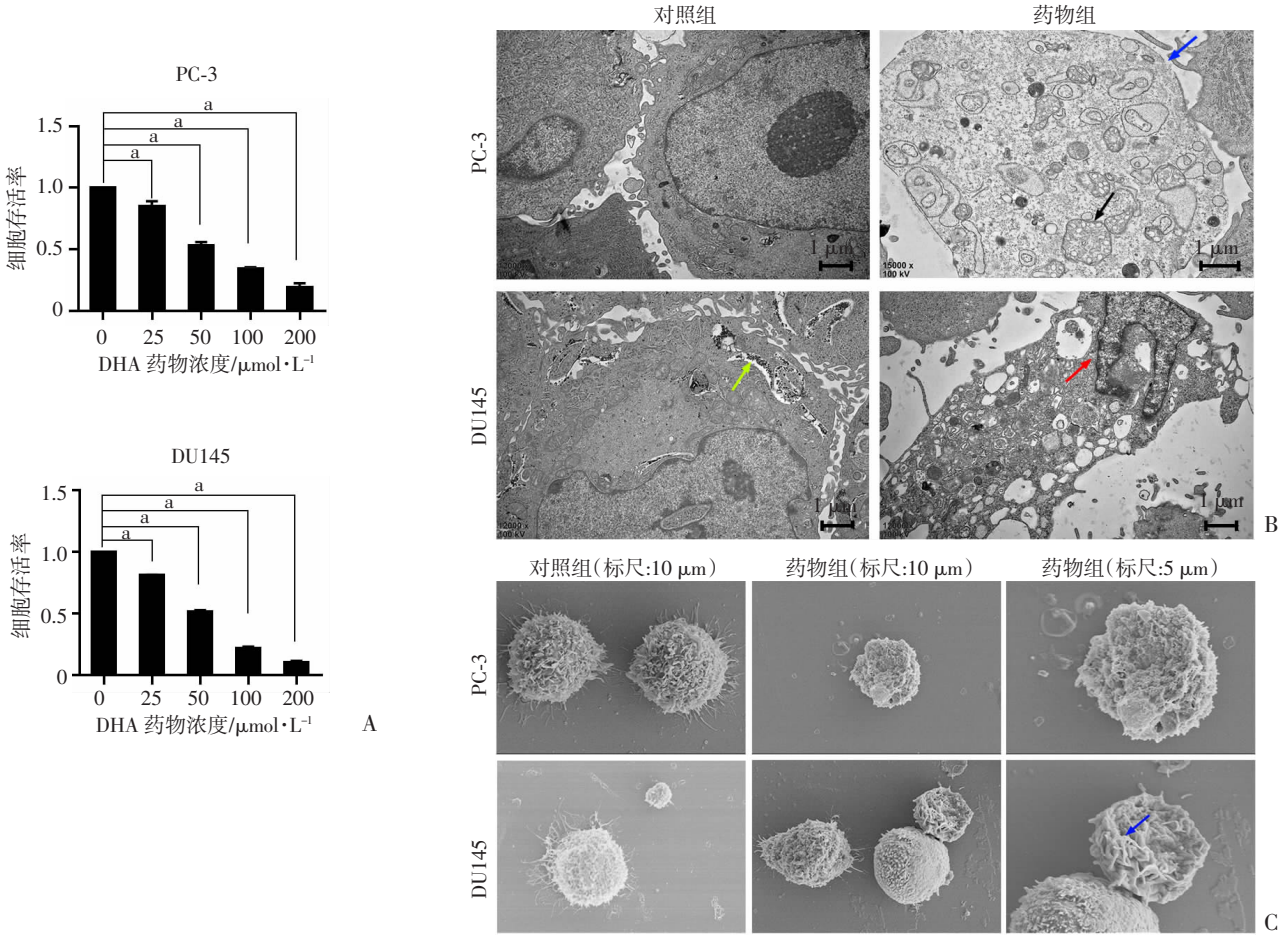
生物信息学分析使用 R 语言 ggplots2 软件对 TCGA 数据进行编辑。采用 GraphPad Prism 9(美国 GraphPad Software Inc.)绘制数据并进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　DHA 作用下非雄激素依赖性 PCa 细胞 PC-3 和 DU145 的体外实验

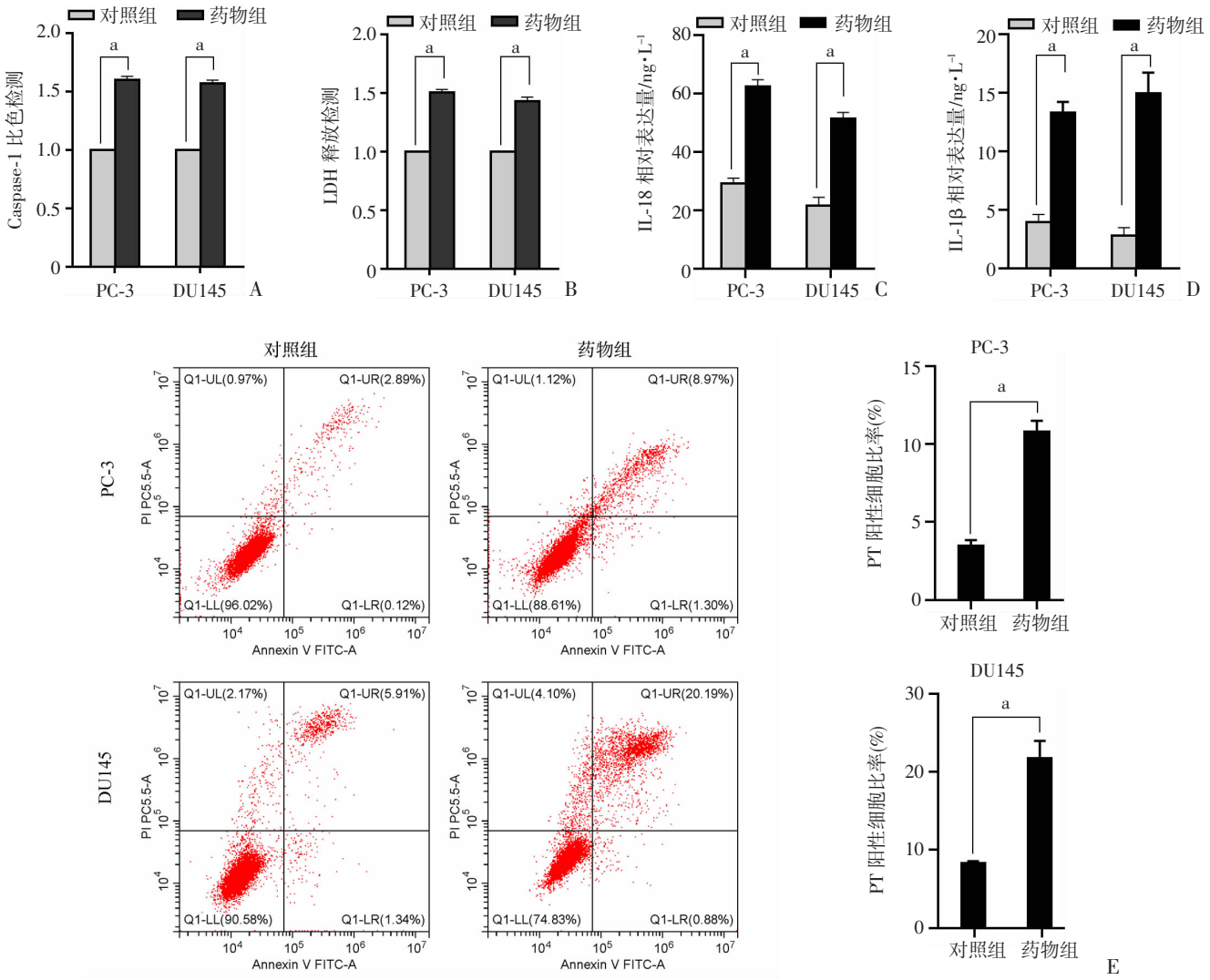
2.1.1　DHA 对 PC-3 和 DU145 细胞的增殖及形态学影响　　采用 CCK-8 检测非雄激素依赖性 PCa 细胞株 PC-3 和 DU145 的细胞增殖情况,结果显示 PC-3 和 DU145 细胞均表现出浓度依赖性的增殖抑制(图 1A)。根据计算获得二者的 IC_{50}[PC-3:(46.70±0.83)μmol/L;DU145:(48.13±0.94)μmol/L],确定最适药物浓度(均选取 50 μmol/L)分别对 PC-3 和 DU145 进行加药处理,电镜下形态学观察可见:不同于其他细胞死亡形式,细胞焦亡的特征为细胞膜完整性的缺失以及细胞内容物的释放。透射电镜图像显示细胞内吹泡样改变、线粒体肿胀、细胞膜破裂(图 1B)。扫描电镜观察显示细胞膜形成孔道,丧失完整性(图 1C)。表明 DHA 可诱导 PC-3 和 DU145 发生焦亡样形态学改变。

2.1.2　细胞焦亡的辅助验证　　通过 Caspase-1 比色检测、LDH 释放实验发现,DHA 作用下的 PC-3 和 DU145 胞外 Caspase-1、LDH 水平均有明显上升($P<0.01$,图 2A、B),进一步证明细胞膜完整性缺失导致内容物的释放。ELISA 检测结果显示药物组 IL-18 表达量、IL-1β 表达量较对照组明显增多($P<0.01$,图 2C、D)。Annexin V-PI 双染流式细胞术结果显示,DHA 作用下的药物组 PI 阳性细胞比率明显高于对照组($P<0.01$,图 2E)。



A:DHA 处理 PCa 细胞株 PC-3 和 DU145 48 h 的细胞存活率($n=3$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$;B:透射电镜观察两组 PCa 细胞形态　DHA 处理 PC-3 细胞后,细胞膜完整性缺失(蓝色箭头),细胞内大量空泡(黑色箭头);DU145 细胞含有大量的糖原(绿色箭头),破裂的细胞释放出大量内容物(红色箭头);C:扫描电镜观察正常细胞和破裂细胞形态　DU145 细胞的纤毛较圆钝(蓝色箭头)

图 1　DHA 对 PC-3 和 DU145 细胞的增殖及形态学影响



a:$P<0.01$

A:Caspase-1 比色检测;B:LDH 释放实验检测;C:ELSIA 检测 IL-18 表达;D:ELSIA 检测 IL-1β 表达;E:Annexin V-PI 双染流式细胞术检测

图 2 细胞焦亡的辅助验证 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

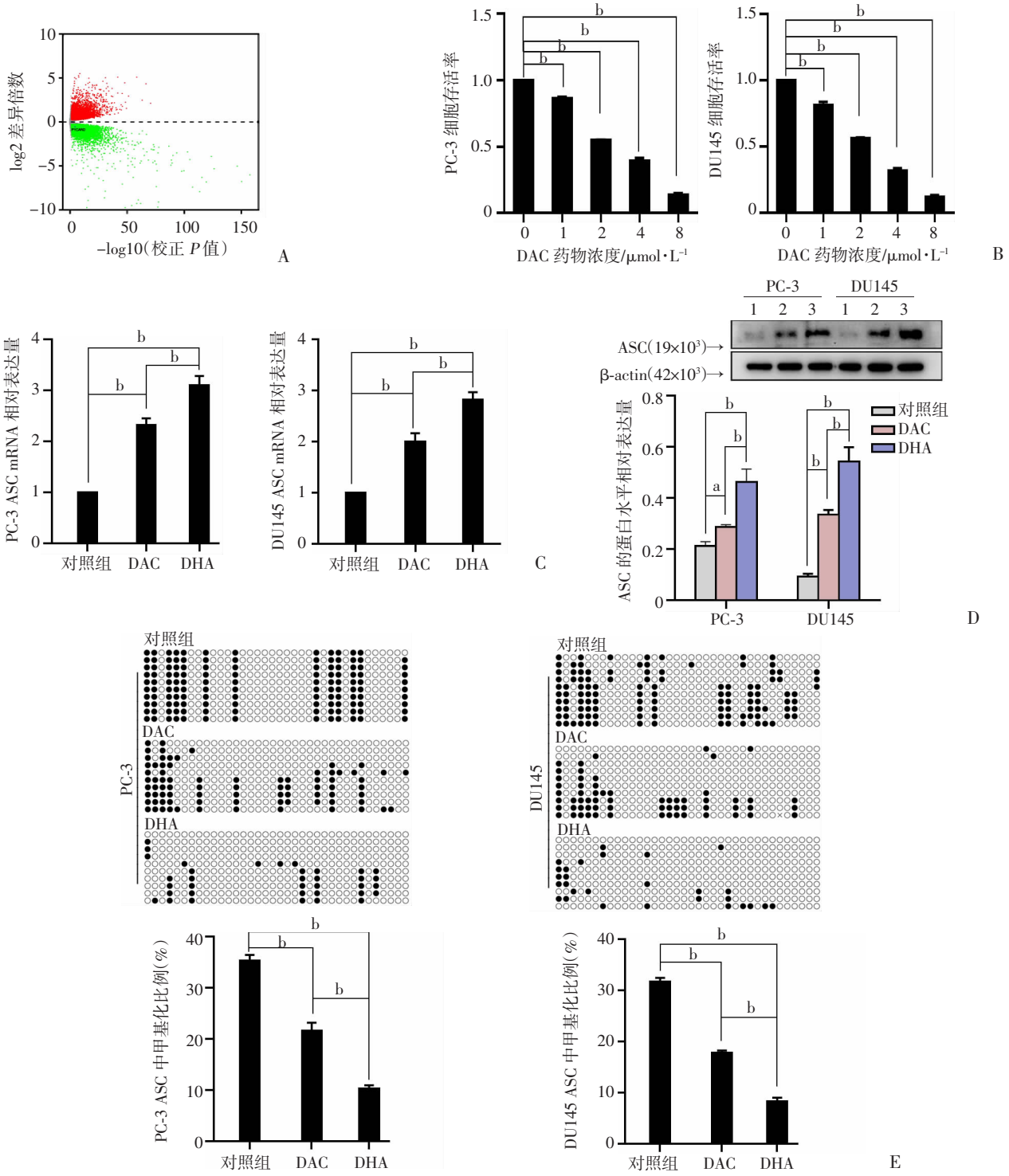
2.1.3 DHA 对 PC-3、DU145 的抑癌基因 *ASC* 的表达调控 生物信息学分析显示,相比于正常前列腺细胞,抑癌基因 *ASC* 在 PCa 细胞中表达明显下调($P<0.05$,图 3A)。以不同浓度 DAC 作用于 PC-3、DU145 观察细胞增殖情况(图 3B),分别以 DHA 和 DAC[根据 IC_{50} 结果,PC-3:(2.64±1.02)μmol/L;DU145:(2.47±1.02)μmol/L;均选取 2 μmol/L]的最适药物浓度作用于 PC-3 和 DU145 细胞检测 *ASC* 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果发现 DHA 对 *ASC* 表达的上调作用在两种细胞中均优于 DAC($P<0.01$,图 3C、D)。通过亚硫酸氢盐测序实验,结果显示 DHA 的去甲基化效果明显优于 DAC($P<0.01$,图 3E)。

2.1.4 DHA 对 PC-3、DU145 的 *AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD* 的 mRNA 及蛋白表达影响 通过实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹法检测 *ASC* 上下游基因 *AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD* 的表达水平,结果显示在 PC-3 和 DU145 细胞中,DHA 均明显上调 *AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD* 和 *GSDMD-N* 端的基因表达($P<0.01$,图 4)。细胞焦亡相关蛋白的表达上调辅助验证 DHA 作用下 PCa 细胞发生细胞焦亡。

2.2 DHA 作用下非雄激素依赖性 PCa 细胞 PC-3 和 DU145 的体内实验

选择 PCa 骨转移细胞系、恶性程度高、浸润侵袭性较强的 PC-3 细胞构建裸鼠种植瘤模型。结果显示,药物组的肿瘤体积小于对照组(图 5A),提示 DHA 显著抑制肿瘤的生长。通过蛋白免疫印迹法检测目的基因的表达水平,结果显示 *ASC*、*AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD* 和 *GSDMD-N* 端表达恢复(图 5B),与体外实验结果一

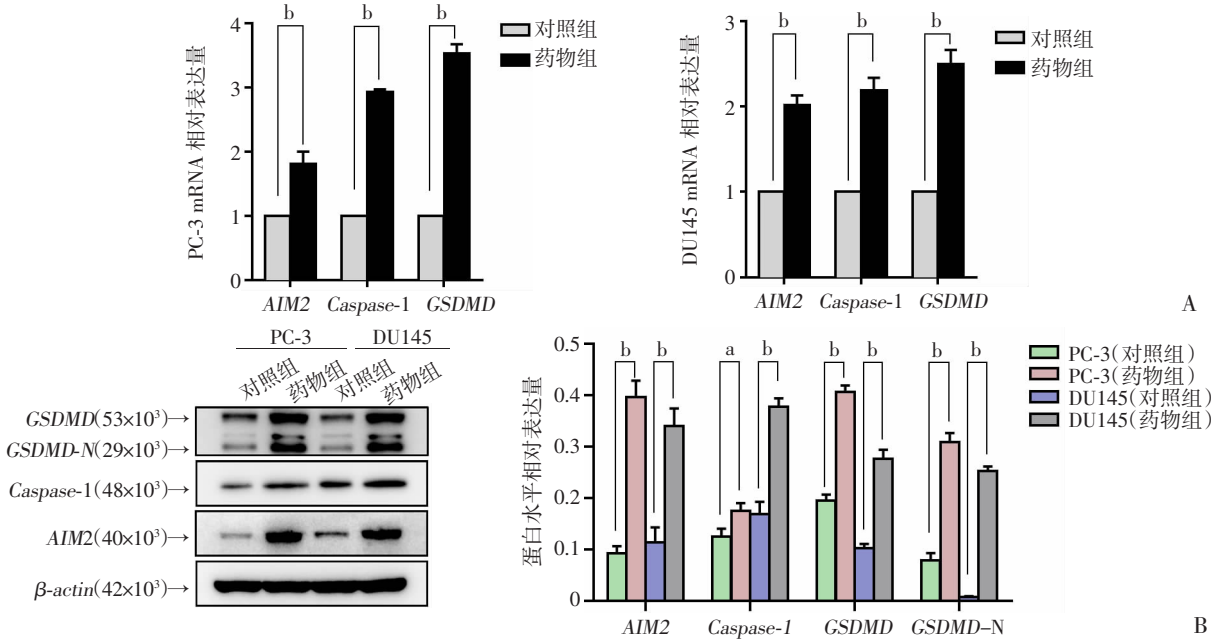
致。电镜观察瘤体组织形态学变化,与正常 PCa 细胞相比,DHA 处理后的小鼠组织细胞丧失膜的完整性,并释放内容物至细胞外(图 5C),该图像结果与体外实验保持一致。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

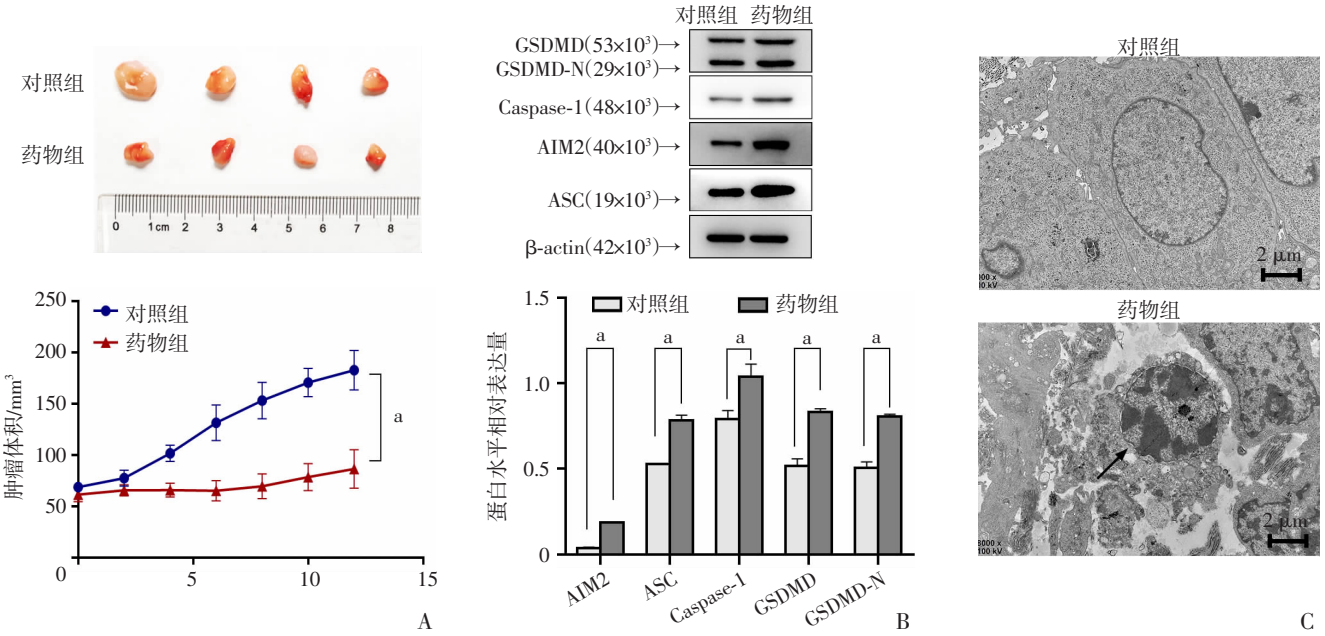
A:生物信息学分析火山图 红点和绿点分别表示与正常前列腺细胞相比,在 PCa 中显著上调和下调的差异基因,灰点表示差异不显著的基因;B:DAC 处理 PCa 细胞株 PC-3 和 DU145 48 h 的细胞存活率;C:实时荧光定量 PCR 检测 ASC mRNA 水平的相对表达量;D:蛋白免疫印迹法测定 ASC 蛋白表达水平　1:对照组;2:DAC;3:DHA;E:对 PC-3 和 DU145 细胞中对 ASC 的每个 CpG 位点(圆点)进行亚硫酸氢盐基因组测序　黑色圆点:甲基化 CpG 位点;中空圆点:未甲基化的 CpG 位点;柱状图为根据亚硫酸氢盐基因组测序分析 ASC 的甲基化率

图 3　差异表达基因 ASC 及其甲基化状态　($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$ A:RT-qPCR 检测 *AIM2*、*Caspase*-1 和 *GSDMD* 的 *mRNA* 水平的相对表达量;B:蛋白免疫印迹法测定 *AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD* 和 *GSDMD-N* 端的蛋白水平表达

图 4 焦亡相关基因在 mRNA 和蛋白水平的表达情况 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$ A:肿瘤体积与肿瘤生长曲线;B:蛋白免疫印迹法测定肿瘤组织的 *AIM2*、*ASC*、*Caspase*-1、*GSDMD* 和 *GSDMD-N* 端的蛋白表达水平;C:透射电镜观察瘤体组织的形态学表现 ↑:示细胞膜破裂的焦亡样形态学改变

图 5 DHA 治疗处理的裸鼠成瘤实验 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

与早期 PCa 相比,晚期 PCa 的药物治疗选择较为棘手。近年来,DHA 药物的抗肿瘤潜力得到关注,抗肿瘤机制的研究在临床用药领域取得较大突破[26-27]。与传统的抗肿瘤药物不同,DHA 具有毒副作用小、对正常细胞伤害小等明显优势[28]。本课题组前期研究发现,低剂量 DHA 诱导 PCa 细胞凋亡的作用有限,但能明显抑制肿瘤生长,其抑癌机制与调控关键因子的甲基化水平有关。结合在 PCa 细胞中发现细胞焦亡样改变,而焦亡经典途径中的关键因子因高甲基化状态致使表达沉默,这为探索 DHA 通过细胞焦亡途径抗

肿瘤的机制研究提供了一条有前景的思路。近年国外研究也证实 DHA 可促进多种肿瘤发生细胞焦亡[29],在本课题组前期 DHA 调控细胞甲基化状态的研究成果基础上,本研究旨在结合表观遗传学机制与细胞焦亡来探讨 DHA 对 PCa 的抗肿瘤作用。

本研究结果表明 DHA 在体内实验和体外实验均对肿瘤的抑制作用显著,电镜观察到细胞膜完整性缺失、内容物释放等焦亡样形态学改变。Caspase-1 比色检测、LDH 释放实验、ELSIA 检测结果显示在 DHA 诱导细胞焦亡过程中,细胞膜破裂导致细胞内容物 Caspase-1、LDH 释放至胞外,炎性因子 IL-18、IL-1β 表达升高,提示焦亡作用产生炎性反应。确认细胞焦亡的表型改变后,由此将展开对细胞焦亡的机制探索。细胞焦亡众多通路中,仅经典途径与非雄激素依赖性 PCa 关系紧密[19]。在经典途径中,抑癌基因 *ASC* 与上游 *AIM2* 特异性结合,形成炎性小体激活下游 *Caspase*-1 裂解 *GSDMD*,从而诱导细胞焦亡[20,30-31]。结合前期实验了解到,表观遗传学机制与肿瘤的发生发展密切相关,转录水平的改变是引起肿瘤发生的重要因素[32]。表观遗传学机制中,在 DNA 甲基转移酶的催化下,甲基团与 CpG 二核苷酸胞嘧啶的第 5 个碳原子共价结合,导致抑癌基因沉默[25]。*ASC* 作为经典通路中诱导焦亡发生不可或缺的重要基因,同时也受表观遗传性学机制的调控[28,33]。由于 PCa 的高甲基化状态抑制了 *ASC* 的正常表达,导致肿瘤的发生[24],本研究通过生物信息学分析验证了这一观点。但是 *ASC* 的甲基化是一个可逆的过程,本课题组前期研究发现 DHA 具有逆转甲基化的作用[17]。因此本研究通过亚硫酸氢盐测序检测 DHA 作用下 *ASC* 的甲基化表达变化。为了比较 DHA 的去甲基化效果和临床适用性,将 DAC 作为阳性对照,结果显示与临床的抗肿瘤药物和甲基化抑制剂相比,DHA 在抑制肿瘤增殖和 *ASC* 的去甲基化效果方面均优于 DAC,这为 DHA 抗癌机理的探索提供了一个新的视角。通过实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹法检测 *ASC* 表达恢复后的上下游基因 *AIM2*、*Caspase*-1、*GSDMD* 和 *GSDMD-N* 端的表达水平改变情况发现,DHA 明显恢复以上焦亡相关蛋白的表达,进一步为 DHA 诱导 PCa 细胞焦亡提供实验依据,但其深入机制仍需继续探索。

为了进一步验证 DHA 诱导焦亡以达到抗肿瘤的实际效用,本研究选取 4~6 周龄雄性裸鼠构建模型并对药物组行 DHA 治疗。结果显示 DHA 治疗明显抑制肿瘤生长;电镜观察瘤体组织也显示了焦亡现象的发生,以上实验均证实了体外实验中 DHA 抑制肿瘤增殖并诱导细胞焦亡的结果。蛋白免疫印迹法检测瘤体组织中目的基因的表达情况,结果显示焦亡相关蛋白的表达上调进一步证实体外实验的结果。

综上所述,本研究将传统药物与新型抗肿瘤手段相结合,同时进行体外实验和体内实验探究 DHA 诱导非雄激素依赖性 PCa 产生焦亡以达到抗肿瘤的作用,通过恢复 *ASC* 的表达改变,以期探索 DHA 诱导焦亡产生的具体机制,为 DHA 作为临床抗肿瘤药物的研究提供理论基础,为临床抗癌新药的选择提供更多可能性。

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] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI: 10.3322/caac.21551.

[3] PERNAR C H, EBOT E M, WILSON K M, *et al*. The epidemiology of prostate cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, 8(12): a030361. DOI: 10.1101/cshperspect.a030361.

[4] 顾秀瑛, 郑荣寿, 张思维, 等. 2000—2014 年中国肿瘤登记地区前列腺癌发病趋势及年龄变化分析[J]. 中华预防医学杂志, 2018,52 (6): 586-592. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2018.06.006.
GU X Y, ZHENG R S, ZHANG S W, *et al*. Analysis on the trend of prostate cancer incidence and age change in cancer registration areas of China, 2000 to 2014[J]. Chin J Prev Med, 2018,52(6): 586-592. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2018.06.006.

[5] KOJIMA S, GOTO Y, NAYA Y. The roles of microRNAs in the progression of castration-resistant prostate cancer[J]. J Hum Genet, 2017, 62(1): 25-31. DOI: 10.1038/jhg.2016.69.

[6] SKVORTSOV S, SKVORTSOVA I I, TANG D, *et al*. Concise review: prostate cancer stem cells: current understanding[J]. Stem Cells, 2018, 36(10): 1457-1474. DOI: 10.1002/stem.2859.

[7] KAJUBI R, OCHIENG T, KAKURU A, *et al*. Monthly sulfadoxine-pyrimethamine versus dihydroartemisinin-piperaquine for intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a double-blind, randomised, controlled, superiority trial[J]. Lancet, 2019, 393(10179): 1428-1439. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32224-4.

[8] YANG J, HE Y K, LI Y B, *et al*. Advances in the research on the targets of anti-malaria actions of artemisinin[J]. Pharmacol Ther, 2020, 216: 107697. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107697.

[9] SUÁREZ-POZOS E, MARTÍNEZ-LOZADA Z, MÉNDEZ-FLORES O G, *et al*. Characterization of the cystine/glutamate antiporter in cultured Bergmann Glia cells[J]. Neurochem Int, 2017, 108: 52-59. DOI: 10.1016/j.neuint.

2017.02.011.

[10] THITA T, JADSRI P, THAMKHANTHO J, *et al*. Phenotypic and genotypic characterization of Thai isolates of Plasmodium falciparum after an artemisinin resistance containment project[J]. Malar J, 2018, 17(1): 197. DOI: 10.1186/s12936-018-2347-9.

[11] DU S J, XU G, ZOU W Q, *et al*. Effect of dihydroartemisinin on $UHRF_1$ gene expression in human prostate cancer PC-3 cells[J]. Anticancer Drugs, 2017, 28(4): 384-391. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000469.

[12] ROGERS C, FERNANDES-ALNEMRI T, MAYES L, *et al*. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death[J]. Nat Commun, 2017, 8: 14128. DOI: 10.1038/ncomms14128.

[13] DHURIYA Y K, SHARMA D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death[J]. J Neuroinflamm, 2018, 15(1): 199. DOI: 10.1186/s12974-018-1235-0.

[14] JIANG L Z, POON I K H. Methods for monitoring the progression of cell death, cell disassembly and cell clearance [J]. Apoptosis, 2019, 24(3/4): 208-220. DOI: 10.1007/s10495-018-01511-x.

[15] KIANI B H, KAYANI W K, KHAYAM A U, *et al*. Artemisinin and its derivatives: a promising cancer therapy[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(8): 6321-6336. DOI: 10.1007/s11033-020-05669-z.

[16] LIU Y M, GAO S J, ZHU J, *et al*. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway[J]. Cancer Med, 2018, 7(11): 5704-5715. DOI: 10.1002/cam4.1827.

[17] XIA T, LIU S H, XU G, *et al*. Dihydroartemisinin induces cell apoptosis through repression of $UHRF_1$ in prostate cancer cells[J]. Anti Cancer Drugs, 2021, 33(1): e113-e124. DOI: 10.1097/cad.0000000000001156.

[18] FANG Y, TIAN S W, PAN Y T, *et al*. Pyroptosis: a new frontier in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109595. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109595.

[19] PANCHANATHAN R, RAMALINGAM V, LIU H Z, *et al*. Human prostate epithelial cells activate the AIM2 inflammasome upon cellular senescence: role of POP_3 protein in aging-related prostatic inflammation[J]. Life (Basel), 2021, 11(4): 366. DOI: 10.3390/life11040366.

[20] WANG B, TIAN Y, YIN Q. AIM2 inflammasome assembly and signaling[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1172: 143-155. DOI: 10.1007/978-981-13-9367-9_7.

[21] WANG B, YIN Q. AIM2 inflammasome activation and regulation: a structural perspective[J]. J Struct Biol, 2017, 200(3): 279-282. DOI: 10.1016/j.jsb.2017.08.001.

[22] KESAVARDHANA S, KANNEGANTI T D. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction[J]. Int Immunol, 2017, 29(5): 201-210. DOI: 10.1093/intimm/dxx018.

[23] WANG S P, TAILOR K, KWABI-ADDO B. Androgen-induced epigenetic profiles of polycomb and trithorax genes in prostate cancer cells[J]. Anticancer Res, 2020, 40(5): 2559-2565. DOI: 10.21873/anticanres.14226.

[24] YANG Y Q, FUENTES F, SHU L M, *et al*. Epigenetic CpG methylation of the promoter and reactivation of the expression of GSTP1 by astaxanthin in human prostate LNCaP cells[J]. AAPS J, 2017, 19(2): 421-430. DOI: 10.1208/s12248-016-0016-x.

[25] LI Y, MENG L Y, SHI T, *et al*. Diagnosis and prognosis potential of four gene promoter hypermethylation in prostate cancer[J]. Cell Biol Int, 2021, 45(1): 117-126. DOI: 10.1002/cbin.11474.

[26] MOHAMED S H, ELGIUSHY H R, TAHA H B, *et al*. An investigative study of antitumor properties of a novel thiazolo [4, 5-d] pyrimidine small molecule revealing superior antitumor activity with CDK1 selectivity and potent pro-apoptotic properties[J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(17): 115633. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115633.

[27] DAI X S, ZHANG X Y, CHEN W, *et al*. Dihydroartemisinin: a potential natural anticancer drug[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(2): 603-622. DOI: 10.7150/ijbs.50364.

[28] WANG L, LI J C, SHI X L, *et al*. Antimalarial Dihydroartemisinin triggers autophagy within HeLa cells of human cervical cancer through Bcl-2 phosphorylation at Ser70[J]. Phytomedicine, 2019, 52: 147-156. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.221.

[29] LI Y Q, WANG W, LI A X, *et al*. Dihydroartemisinin induces pyroptosis by promoting the AIM2/caspase-3/DFNA5 axis in breast cancer cells[J]. Chem Biol Interact, 2021, 340: 109434. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109434.

[30] GENÇ H, HAZUR J, KARAKAYA E, *et al*. Differential responses to bioink-induced oxidative stress in endothelial cells and fibroblasts[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2358. DOI: 10.3390/ijms22052358.

[31] ARIOTTI N, WU Y P, OKANO S, *et al*. An inverted CAV1 (caveolin 1) topology defines novel autophagy-dependent exosome secretion from prostate cancer cells[J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2200-2216. DOI: 10.1080/15548627.2020.1820787.

[32] WANG Y P, GAO W Q, SHI X Y, *et al*. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature, 2017, 547(7661): 99-103. DOI: 10.1038/nature22393.

[33] SHEN C, LU A, XIE W J, *et al*. Molecular mechanism for NLRP6 inflammasome assembly and activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(6): 2052-2057. DOI: 10.1073/pnas.1817221116.

(收稿:2022-02-25;修回:2022-04-08)

(编辑 汪勤俭)