DOI:10.16016/j.2097-0927.202205059

Smad3 通过 p38/MAPK 信号通路调控细胞自噬及凋亡促进胰腺癌进程

张旭东[1],刘浩昂[1],王志浩[1],兰 凯[1],陈 蕊[2],李 凯[1],刘树义[1],Rajiv Kumar JHA[1] 710021 西安,西安医学院临床医学院中尼友好拉吉姆医学实验室[1];710077 西安,西安医学院第一附属医院妇产科[2]

[摘要] **目的** 观察 Smad3 对胰腺癌细胞 Panc-1、BxPC-3 凋亡、自噬的影响,初步探讨 Smad3 表达水平影响胰腺癌进程的可能机制。**方法** 基于 GEPIA2 数据库进行生物信息学分析,探究 Smad3 与胰腺癌发生、发展及生存的相关性。利用 CRISPR/Cas9 系统以及短发卡 RNA(ShRNA)敲除及敲减 Smad3 的表达,采用 Real-Time quantitative PCR(qPCR)和 Western blot 检测细胞中 Smad3 mRNA 和蛋白水平变化。实验组转入 ShSmad3-1、ShSmad3-2 序列,将不靶向任何基因的 Sh-Scramble 序列作为对照组(Scr)。将转入 Smad3 guide RNA(gRNA)序列作为 CRISPR/Cas9 的实验组,转入空载质粒的作为 CRISPR/Cas9 的对照组。采用 Western blot 检测细胞中 LC3、p62、p38 以及 p-p38 蛋白变化情况,同时在敲减 Smad3 的胰腺癌细胞用 PI-Annexin V 试剂盒染色并进行流式分析。利用 pLVX-Smad3 质粒进行回补实验,并用 p38 抑制剂 SB203580 处理细胞检测相关蛋白的变化情况。**结果** GEPIA2 数据库及临床标本分析结果显示,Smad3 在胰腺癌组织中高表达($P<0.05$)。在胰腺癌细胞 BxPC-3 中转入 ShSmad3-1、ShSmad3-2 后,Smad3 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低($P<0.05$)。同时在 Panc-1 中转入 Smad3 guide RNA 筛选到 2 个 Smad3 敲除细胞系。与对照组相比,敲减 Smad3 胰腺癌细胞凋亡显著增加($P<0.05$)。Western blot 实验发现:Smad3 敲减及敲除后,p-p38 的蛋白水平显著增加($P<0.05$),LC3、p62 水平显著降低($P<0.05$)。进一步通过回补实验及利用 SB203580 处理胰腺癌细胞,发现 p62、LC3 蛋白水平能回复($P<0.01$)。**结论** 干扰 Smad3 促进胰腺癌细胞过度自噬,进而导致细胞凋亡增加,可能与激活 p38/MAPK 信号通路有关。

[关键词] Smad3;胰腺癌;细胞凋亡;自噬

[中图法分类号] R394.2; R730.23; R735.9 [文献标志码] A

Smad3 promotes pancreatic cancer progression by regulating autophagy and apoptosis through p38/MAPK signaling pathway

ZHANG Xudong[1], LIU Hao'ang[1], WANG Zhihao[1], LAN Kai[1], CHEN Rui[2], LI Kai[1], LIU Shuyi[1], Rajiv Kumar JHA[1]

[1]China-Nepal Friendship Medical Research Center of Rajiv Kumar Jha, School of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710021; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710077, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Smad3 on the apoptosis and autophagy of pancreatic cancer cells Panc-1 and BxPC-3, in order to preliminarily verify the effect of Smad3 expression in the progression of pancreatic cancer. **Methods** Bioinformatics analysis was performed based on GEPIA2 database to explore the correlation of Smad3 with the occurrence, development, and survival of pancreatic cancer. The CRISPR/Cas9 system and short hairpin RNA (sh-RNA) were used respectively to knock out or reduce the expression of Smad3. Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blotting were subsequently adopted to detect the changes of Smad3 at mRNA and protein levels. The sh-RNA experimental groups were transferred with ShSmad3-1 and ShSmad3-2 sequences, and the CRISPR/Cas9 experimental group were

[基金项目] 陕西省高校科协青年托举计划项目(20200314);陕西省科技厅面上项目(2021JM-495);国家自然科学基金国际合作交流项目(81550110256)

[通信作者] Rajiv Kumar JHA,E-mail:rajiv12@hotmail.com

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/)

transferred with Smad3 guide RNA (gRNA) sequence, using Sh-Scramble sequence (Scr) and empty plasmid as the corresponding control groups, respectively. Western blotting was applyed to determine the protein changes of LC3, p62, p38 and p-p38 in the cells. Meanwhile, Smad3 knockdown pancreatic cancer cells were stained with PI-Annexin V kit and then analyzed by flow cytometry. To further prove the effect of Smad3 on pancreatic cancer cells, the pLVX-Smad3 plasmid was used to perform a rescue experiment, and in another assay, the cells were treated with p38 inhibitor SB203580 to observe the changes of related proteins. **Results** The results of GEPIA2 database and clinical specimen analysis showed that Smad3 was highly expressed in pancreatic cancer tissues ($P<0.05$). After transfection of ShSmad3-1 and ShSmad3-2 into pancreatic cancer cells BxPC-3, both the mRNA and protein levels of Smad3 were significantly decreased ($P<0.05$). Meanwhile, 2 Smad3 knockout cell lines were screened out after transferring gRNA into Panc-1. As compared with the control group, Smad3 knockdown remarkably increased the apoptosis of pancreatic cancer cells ($P<0.05$), and Western blotting also indicated that after Smad3 knockdown or knockout, the protein level of p-p38 was up-regulated ($P<0.05$), while those of LC3 and p62 were down-regulated ($P<0.05$). Further study found that the protein levels of p62 and LC3 were restored by the rescue assay as well as by the treatment of pancreatic cancer cells with SB203580 ($P<0.01$). **Conclusion** Interference in Smad3 promotes excessive autophagy in pancreatic cancer cells and leads to increased apoptosis, possibly through activation of p38/MAPK signaling pathway.

[**Key words**] Smad3; pancreatic cancer; cell apoptosis; autophagy

Supported by the Young Talents Support Project of Shaanxi Provincial Colleges and Universities and Commission of Science and Technology (20200314), the General Program of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (2021JM-495), and the International (Regional) Cooperation and Exchange Project of National Natural Science Foundation of China (81550110256). Corresponding author: Rajiv Kumar JHA, E-mail: rajiv12@hotmail.com

胰腺癌(pancreatic cancer)发病率逐年增加,位列所有癌症致死原因第5位,是一种恶性程度极高的消化系统肿瘤。由于早期无明显症状、疾病进展快及化疗有效率低,患者预后极差,总体5年生存率仅有8%,又将其称为"癌中之王"[1]。胰腺癌治疗目前主要采取手术为主,并辅助放、化疗的综合治疗手段,但90%的胰腺癌患者经指南推荐的治疗后效果欠佳[2]。因此,深入阐明胰腺癌的发生机制结合分子靶向干预和放化疗,是提高胰腺癌疗效的重要手段[3]。Smad3是重要的细胞内分子,负责将细胞质膜受体信号传至细胞核[4-5]。Smad3作为重要的转录因子,是转移生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)下游的重要靶点。在细胞增殖[6]、损伤修复[7]、纤维化[8]、癌症发展等方面发挥着重要作用[9-10]。在肝癌后期Smad3通过诱导上皮-间质转化促进肿瘤转移[11],然而Smad3在胰腺癌发生、发展中的作用目前仍不清楚。

分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)可将细胞外信息传递至细胞核中,在生理及病理过程中发挥重要的作用。其中p38是重要的应激激酶,能对外界刺激迅速做出反应[12]。p38在体内有α、β、γ和δ 4种亚型,且胰腺癌细胞均表达p38的4种亚型。研究发现降低胰腺癌细胞中p38 α和p38 β的表达能够抑制胰腺癌细胞的体外生长,同时发现p38 α能促进胰腺癌的迁移,而p38 β对胰腺癌的迁移无明显调控作用,由此可见p38/MAPK在胰腺癌中发挥亚型特异性功能[13]。此外,胰腺癌细胞分泌外泌体被T淋巴细胞摄取后激活p38/MAPK信号通路,进而诱导内质网应激介导细胞凋亡,促进胰腺癌发生、发展[14]。

自噬在生物体高度保守是维持机体稳态的重要机制[15-16],依赖溶酶体对细胞组分的降解以维持逆境条件下机体的代谢平衡。自噬异常与胰腺癌等众多肿瘤的发生、发展密切相关[17]。早期研究表明,利用遗传和药理抑制自噬会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,增加DNA损伤和代谢功能障碍,最终抑制胰腺癌的发展[18]。此外,自噬还可以通过降解MHC-I促进胰腺癌的免疫逃避,表明自噬增加有助于胰腺癌的进展[19]。

p38/MAPK信号通路不仅对自噬具有促进和抑制的双重性调控[20],而且也是细胞凋亡的主要调控通路之一。胰腺癌细胞对细胞凋亡有抵抗力,从而促进其侵袭性和对常规治疗方式的抵抗力[21]。因此,靶向细胞凋亡途径是胰腺癌治疗的新思路。在生物体内细胞自噬与凋亡过程存在十分复杂的相互作用关系,过度自噬会诱导细胞凋亡。本研究通过干预Smad3的表达初步探讨Smad3对胰腺癌细胞Panc-1、BxPC-3自噬和凋亡的影响机制,进而初步验证Smad3表达水平在人胰腺癌诊断和进展中的价值;同时探究Smad3对胰

腺癌细胞自噬的调控能力,以期为胰腺癌的治疗提供新的靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、标本及试剂

人的胰腺癌细胞系 Panc-1、AsPC-1、BxPC-3 购自美国 ATCC 细胞库(American Type Culture Collection);胰腺正常导管上皮细胞 HPDE 购自武汉普诺赛公司。对照和胰腺癌患者组织标本来自 2015-2020 年西安医学院第一附属医院和咸阳人民医院。标本获取经捐赠者或亲属的书面知情同意,研究获得西安医学院第一附属医院伦理委员会的批准(XYL2022122)。主要试剂:胎牛血清、DMEM 细胞培养基、胰蛋白酶购自 HyClone 公司;Lipofectamine™2000 购自美国英杰生命技术有限公司;总蛋白提取试剂盒、PI-Annexin-V 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;抗体 Smad3、p-Smad3 购自爱博泰克生物有限公司;GAPDH 购自康成生物技术有限公司;p-p38、p38、LC3、p62 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;SB203580 购自北京索莱宝科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Sigma 公司;DAB 检测试剂盒购自中杉金桥公司。对照组(Sh-Scramble)病毒及 Smad3 敲减序列(Sh-Smad3、CRISPR/Cas9-Smad3)由擎科生物公司合成,见表 1。

1.2 生物信息学分析

利用 GEPIA2 数据库(http://gepia.cancer-pku.cn/)对 Smad3 在胰腺正常组织(n=171)及癌组织(n=179)中的表达差异和存活相关性进行统计学分析。

1.3 免疫组化

将临床标本组织切片放置 60 ℃ 烘箱烘片 1 h,将切片放入环保透明剂中脱蜡 2 次,每次 20 min。之后依次放入 100%、95%、70%、50%乙醇中各水化 5 min,去离子水中浸泡 5~10 min 后置于 10 mmol/L pH 6.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中抗原修复 3.5 min,室温自然冷却。PBS 中浸泡 5~10 min,3% H_2O_2 室温放置 10 min,0.1% TX-100 室温孵育 10 min,PBS 洗 2~3 次,每次 5 min,3% BSA 室温封闭 1 h。一抗 Smad3(1∶500)溶于 1% BSA,4 ℃ 过夜。1×PBS 洗 4 次,每次 5 min,二抗室温孵育 1 h。PBS 洗 4 次,每次 5 min,DAB 显色后,苏木精复染 3~5 min 后自来水充分冲洗显色。1% HCl(75% 乙醇中)水化 5 s,自来水冲洗 3~5 min,95%、100%乙醇各脱水 5 min,最后用中性树胶封片保存。

1.4 细胞培养及分组

胰腺癌细胞株 Panc-1、BxPC-3 生长于 37 ℃、5% CO_2 以及饱和湿度的恒温培养箱中。细胞培养使用含 10% FBS、1%双抗(链霉素、青霉素)的完全培养基,2 d 进行一次传代。敲减实验分为对照组(Scr)和 Smad3 敲减组(ShSmad3-1、ShSmad3-2 组:细胞分别转染 ShSmad3-1、ShSmad3-2 慢病毒);敲除实验分为空白对照组(WT)和 Smad3 敲除组(Smad3 KO-1、Smad3 KO-2 组:Panc-1 细胞分别转入 CRISPR/Cas9-Smad3 质粒,经嘌呤霉素筛选后的单克隆细胞系 1#、2#)。回复实验在敲减实验 3 组基础上再加入 25、50 μmol/L 羟氯喹(HCQ);过表达实验在敲减实验 3 组基础上再加入外源过表达 Smad3(pLVX-Smad3);抑制实验在敲减实验 3 组基础上再加入 p38 抑制剂 SB203580 20 μmol/L(SB203580)。处理细胞 48 h 后,收集各组细胞进行相关检测。

1.5 病毒包装

当 293T 细胞生长至 60%~70%时进行转染。将 PMD2.G、PSPAX2、pLKO.1 sh-Smad3 按 1∶1∶1各 8 μg 及 60 μL 转染试剂 PEI 加入 750 μL DMEM 培养基(不含血清、双抗),混合均匀,室温放置 20 min 后加入 293T 细胞转染 4~6 h,换新鲜完全培养基,继续培养 48 h 可收集培养基上清,1 500×g 离心 10 min,取上清,再用 0.45 μm 滤膜过滤,所得液体即为包装后病毒。

表 1 shSmad3、CRISPR/Cas9-Smad3 与 shScramble 序列

名称	序列(5′→3′)
ShScramble	正义链:CCGGGAACTCGAGTTCACATGGTTCCTCGAGGAACCATGTGAACTCGAGTTCTTTTTG 反义链:AATTCAAAAAGAACTCGAGTTCACATGGTTCCTCGAGGAACCATGTGAACTCGAGTTC
shSmad3-1	正义链:CCGGGAGCCTGGTCAAGAAACTCAACTCGAGTTGAGTTTCTTGACCAGGCTCTTTTTG 反义链:AATTCAAAAAGAGCCTGGTCAAGAAACTCAACTCGAGTTGAGTTTCTTGACCAGGCTC
shSmad3-2	正义链:CCGGTGAGCAGAACAGGTAGTATTACTCGAGTAATACTACCTGTTCTGCTCATTTTTG 反义链:AATTCAAAAATGAGCAGAACAGGTAGTATTACTCGAGTAATACTACCTGTTCTGCTCA
gRNA-1	正义链:CACCGGCTGTAGTCGTCCAGTGGG 反义链:AAACCCCACTGGACGACTACAGCC
gRNA-2	正义链:CACCGCGCTCCGAATTGGAGGGGT 反义链:AAACACCCCTCCAATTCGGAGCGC

1.6 慢病毒感染

BxPC-3 细胞在 6 孔板中长到融合度为 50%~60% 时,按培养基与病毒液体积比 1∶1进行加液,同时加入 1 μL (2 000×) polybrene 混匀。2 d 后,加入 1.5 μg/mL 嘌呤霉素筛选 2 d,收样进行检测。

1.7 CRISPR/Cas9、ShSmad3 质粒构建及 CRISPR/Cas9-Smad3 敲除细胞的筛选

将合成的 gRNA 及 ShRNA 正义链与反义链进行退火,退火产物与经过双酶切的 pLKO.1(*Eco*RⅠ、*Age*Ⅰ)、PX459(*Bbs*Ⅰ)载体进行连接,小提质粒,并经测序验证。

将构建好的针对 Smad3 基因的 CRISPR/Cas9 敲除质粒纯化后转入胰腺癌细胞(Panc-1)中。经过稳定筛选挑单克隆,并通过提取基因组 DNA 和 Western blot 确定其表达情况。经过鉴定筛选 2 个独立的细胞系用于后续实验。基因组 PCR 上游引物序列:5′-GCCTTC-AATATGAAGAAGGAC-3′,下游引物序列:5′-CATTCG-GGTCAACTGGTA-3′。

1.8 细胞计数

将生长良好的 10^5 个细胞铺在 6 孔板上,分别在生长 0、3、5 d 用血球计数板进行细胞计数,并用结晶紫进行染色。

1.9 蛋白提取及 Western blot 检测

收好的细胞加入含有蛋白酶抑制剂的裂解溶液 Lysis Buffer (DTT、mG132、Cocktail、DTT、PhosSTOP)置于冰上,每隔 5 min 剧烈涡旋 1 次,共裂解 20 min 后,12 500×*g*、4 ℃离心 5 min,取上清进行 BCA 蛋白定量,加入对应体积的蛋白上样缓冲液(5×Loading buffer),95 ℃加热 5 min 后进行蛋白电泳。10% SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜(使用前用甲醇浸泡激活 30 s),用含 5%脱脂奶粉的 PBST 摇床封闭 1 h。加入一抗 p-p38、p38、LC3、p62(1∶1 000)、Smad、p-Smad3(1∶1 000)、GAPDH(1∶10 000),4 ℃孵育过夜,PBST 洗膜 4 次,每次 5 min,室温孵育二抗 1 h,PBST 洗膜 4 次,每次 5 min,用 ECL 法发光后胶片曝光。

1.10 PI-Annexin V 染色

BxPC3、Panc-1 胰腺癌细胞用 PBS 洗涤 2 次,用不含 EDTA 的胰酶进行完全消化,1 000×*g* 离心 5 min,弃上清收集细胞,并用 PBS 轻轻重悬细胞计数,然后再 1 000×*g* 离心 5 min,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀,加入 10 μL 碘化丙啶染色液(PI),然后在室温下避光孵育 15 min,最后通过流式细胞仪检测分析。

1.11 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp)与 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.)软件进行数据采集、记录、运算与分析。两组间差异比较采用两独立样本 t 检验,多组间差异比较采用方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Smad3 蛋白表达与胰腺癌的关系

GEPIA2 数据库分析结果显示,与正常胰腺组织相比,Smad3 在胰腺癌组织中高表达($P<0.05$,图 1A),同时在胰腺癌不同分期 Smad3 的表达差异有统计学意义($P=0.003\ 22$,图 1B)。进一步将胰腺癌患者分为 Smad3 高表达组($n=45$)和 Smad3 低表达组($n=45$),通过生存分析发现 Smad3 的表达与胰腺癌患者的生存率呈负相关($P=0.006\ 1$,图 1C)。利用临床病理标本进行免疫组化染色,发现 Smad3 在胰腺癌组织中高表达(图 1D)。

2.2 胰腺癌细胞系中 Smad3 的表达

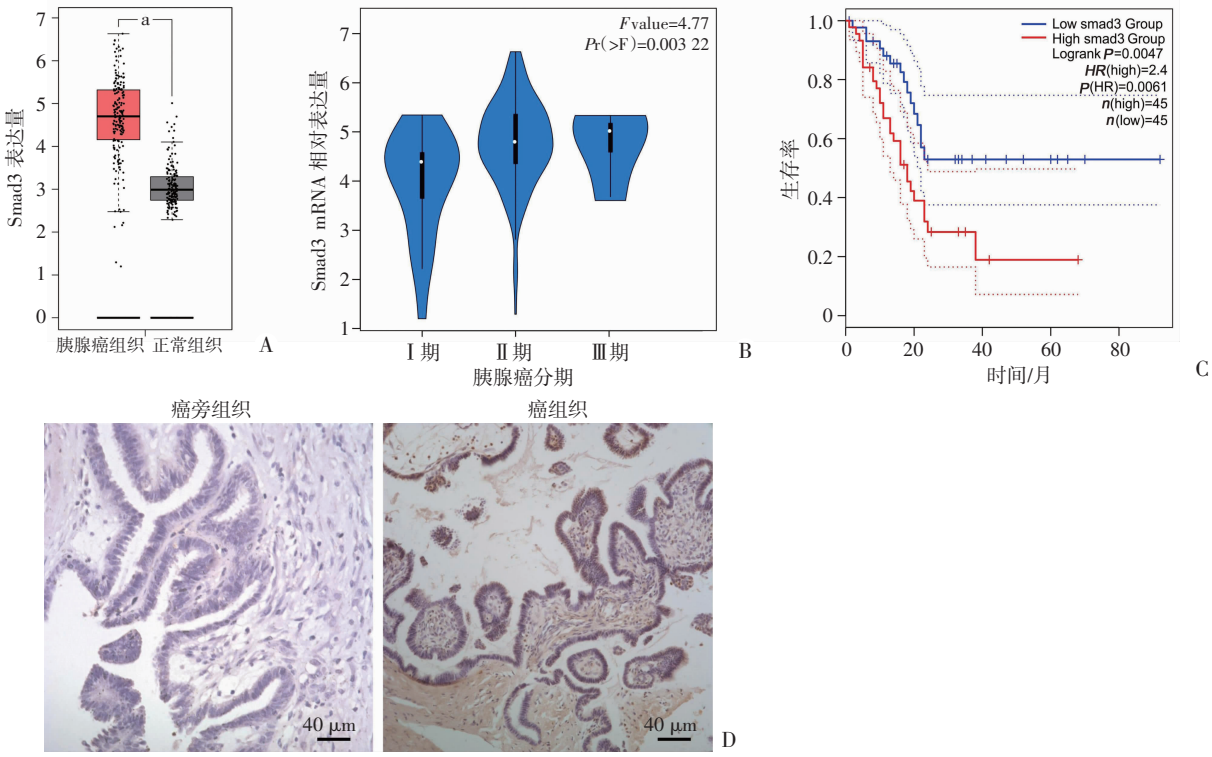
收集胰腺正常导管上皮细胞 HPDE、胰腺癌细胞 BxPC-3、AsPC-1、Panc-1。通过 Western blot 检测 Smad3 的表达情况。与胰腺正常导管上皮细胞相比,Smad3 在胰腺癌细胞 BxPC-3、Panc-1 中表达较高(图 2)。因此,后续实验选择这 2 个细胞系进行。

2.3 胰腺癌细胞系 BxPC-3、Panc-1 中敲除(敲减)Smad3

分别利用 ShRNA 以及 CRISPR/Cas9 两种不同的体系干预 Smad3 的表达。BxPC-3 细胞中转入 ShSmad3-1、ShSmad3-2 慢病毒 72 h 后,qPCR 检测结果显示 Smad3 mRNA 水平下调明显($P<0.05$,图 3A),同时利用 Western blot 从蛋白水平进行验证,发现 2 个 ShRNA 的敲减效果较好(图 3B)。进一步在 Panc-1 细胞中转入 CRISPR/Cas9-Smad3 质粒经嘌呤霉素筛选后挑取单克隆。利用 Western blot 和测序进行验证,发现单克隆细胞系 1#、2#敲除较好(图 3C、D),可以用于后续实验。

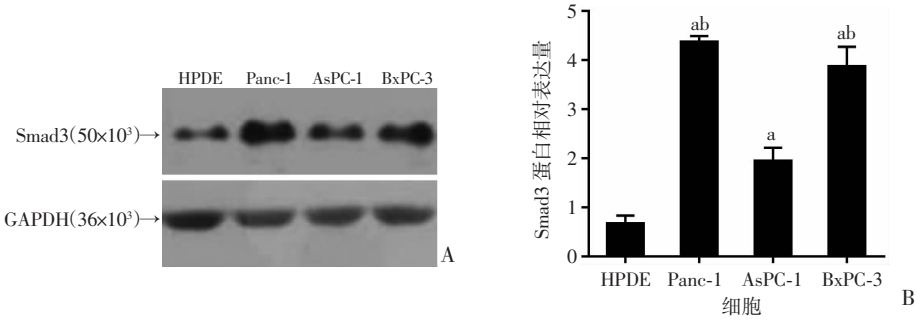
2.4 在胰腺癌细胞中敲减 Smad3 影响细胞凋亡

利用构建好的 Smad3 敲减 BxPC-3 稳转细胞系铺板(10^5 个细胞)绘制细胞的生长曲线(图 4A),并进行结晶紫染色(图 4B)。敲减 Smad3 后,胰腺癌细胞 BxPC-3、Panc-1 的数目均显著减少。同时利用 Smad3 敲减的 Panc-1、BxPC-3 细胞进行 PI-Annexin V 标记并进行流式分析,发现敲减 Smad3 后凋亡细胞显著增加($P<0.05$,图 4C),提示 Smad3 对胰腺癌的发生发展至关重要。



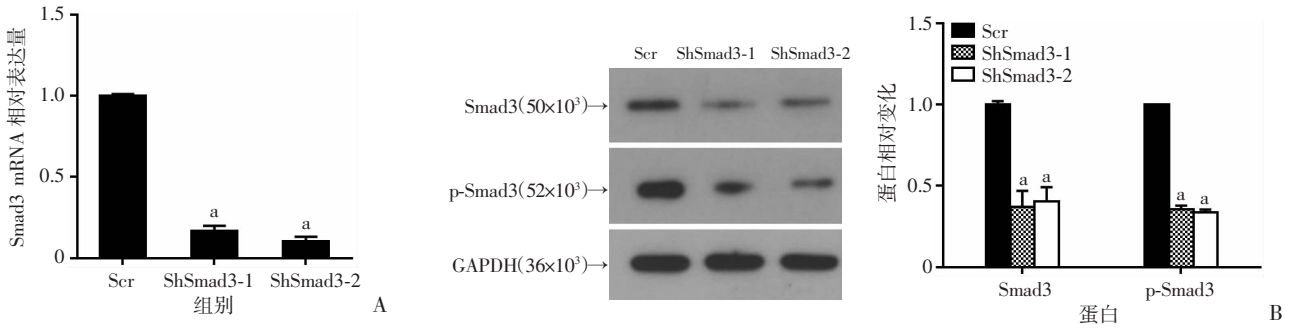
A:GEPIA2 数据库分析胰腺癌组织与正常组织中 Smad3 的表达 a:$P<0.05$;B:GEPIA2 数据库分析胰腺癌不同分期中 Smad3 的表达差异;C:Smad3 表达与患者生存的相关性;D:免疫组化检测 Smad3 在胰腺病理切片中的表达

图 1 Smad3 在正常组织及胰腺癌组织中的表达



A:Western blot 检测 Smad3 的表达;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与 HPDE 比较;b:$P<0.05$,与 AsPC -1 比较

图 2 Smad3 在胰腺正常导管上皮细胞、胰腺癌细胞中的表达

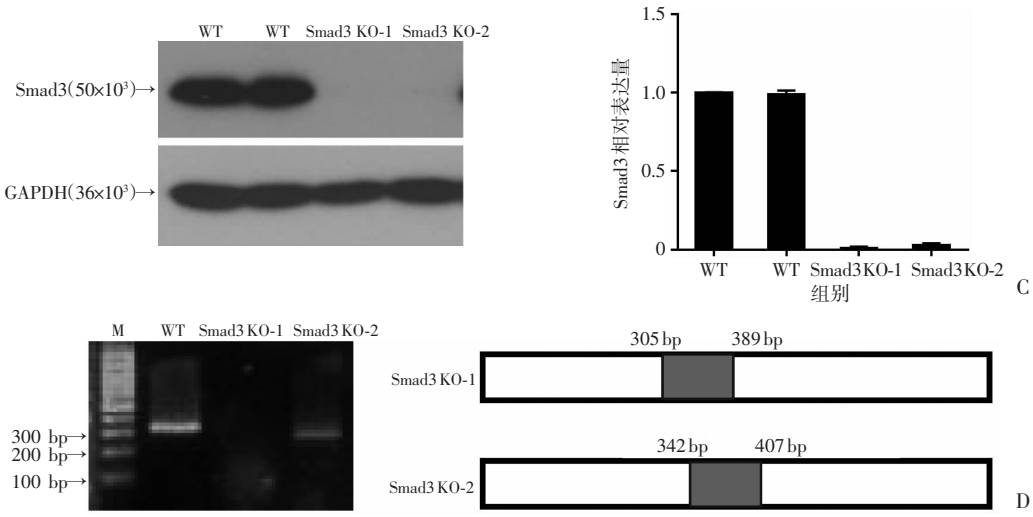


Scr:对照组;ShSmad3-1、ShSmad3-2:Smad3 敲减组;a:$P<0.05$,与对照组(Scr)比较

A:qPCR 检测转入 ShSmad3 后胰腺癌细胞 Smad3 mRNA 变化;B:Western blot 检测 Smad3 的敲减效率

图 3 利用 ShRNA、CRISPR/Cas9 体系敲减及敲除 Smad3 的表达

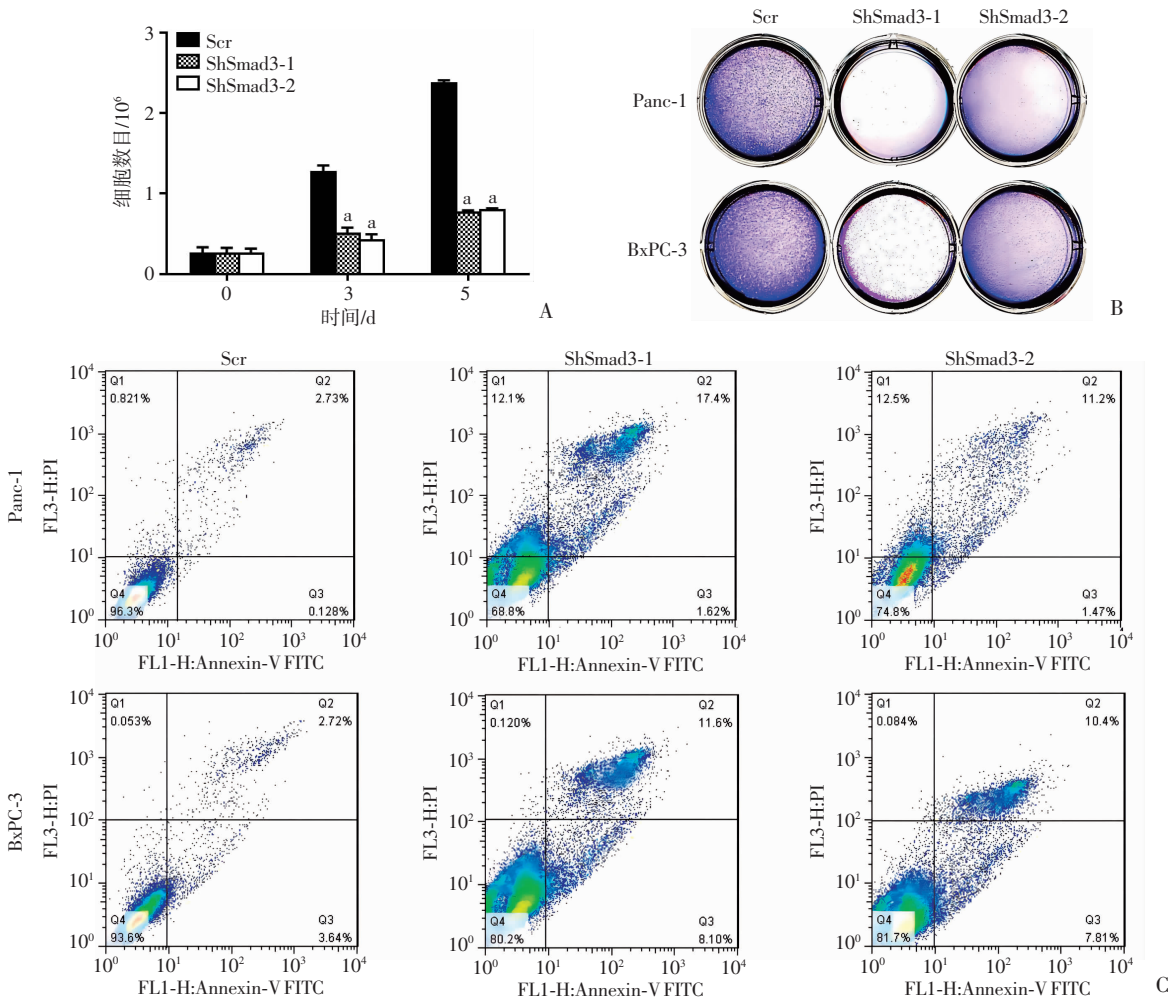
(图 3C、D 续下页)



WT:空白对照组;Smad3-KO:Smad3 敲除组;M:标准

C:Western blot 检测 Smad3 敲除的单克隆细胞系;D:Smad3 敲除单克隆细胞系基因组 PCR 产物

续图 3　利用 ShRNA、CRISPR/Cas9 体系敲减及敲除 Smad3 的表达

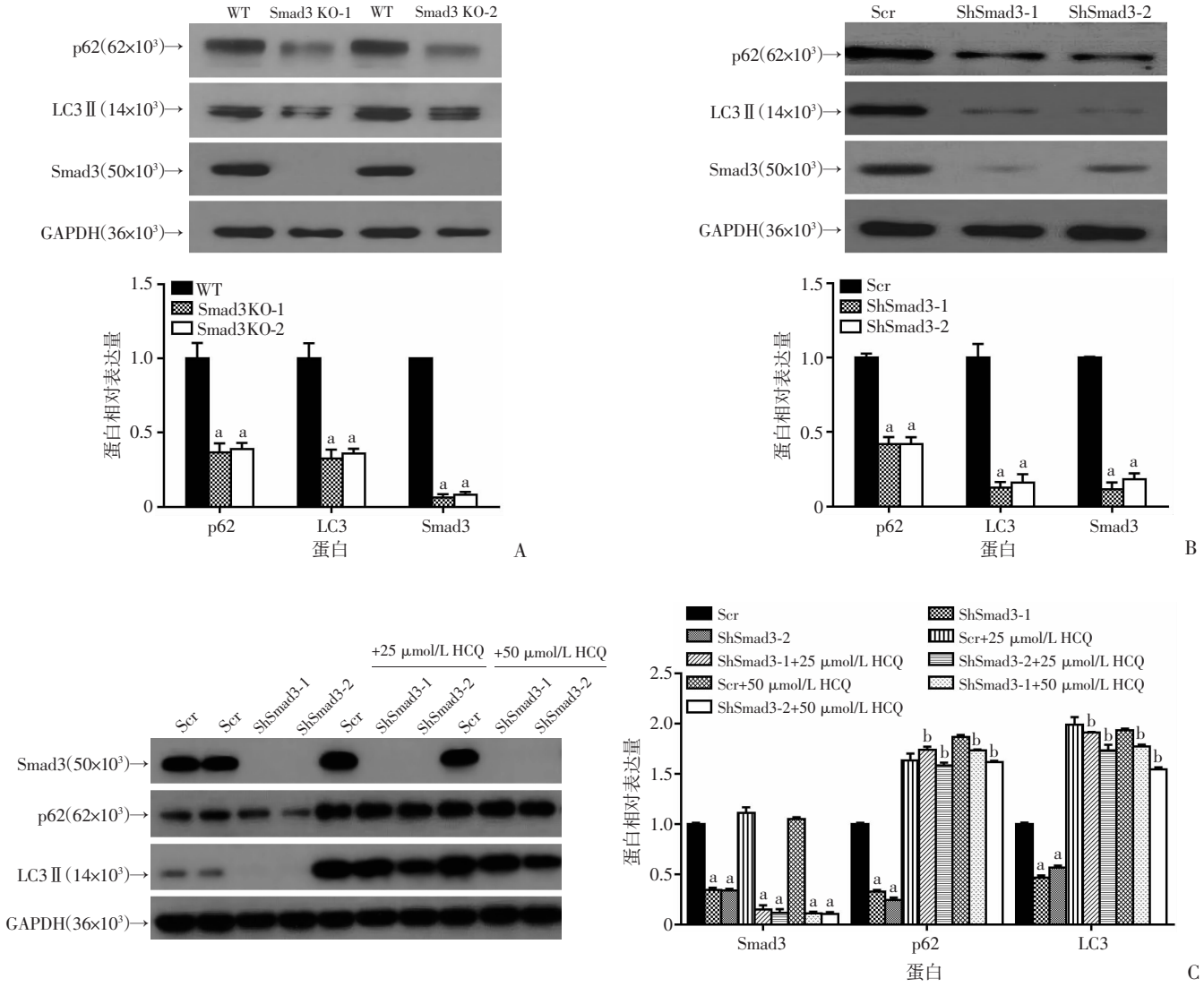


A:敲减 Smad3 后各组胰腺癌细胞计数分析　a:$P<0.05$,与对照组(Scr)比较;B:结晶紫染色观察敲减 Smad3 后各组胰腺癌细胞生长情况;C:流式细胞仪检测敲减 Smad3 后胰腺癌细胞的凋亡情况

图 4　敲减 Smad3 后诱导胰腺癌细胞凋亡增加

2.5 敲除(敲减)Smad3 后自噬蛋白 LC3、p62 蛋白水平降低

在敲除、敲减 Smad3 的 Panc-1 细胞中,LC3、p62 均显著下调(图 5A、B)。同时在 BxPC-3 细胞中利用 shRNA 敲减 Smad3 后加入 25、50 μmol/L 羟氯喹(HCQ),利用 Western blot 检测发现 LC3、p62 蛋白水平能回复(图 5C)。进一步说明降低 Smad3 的表达影响胰腺癌细胞的自噬过程。



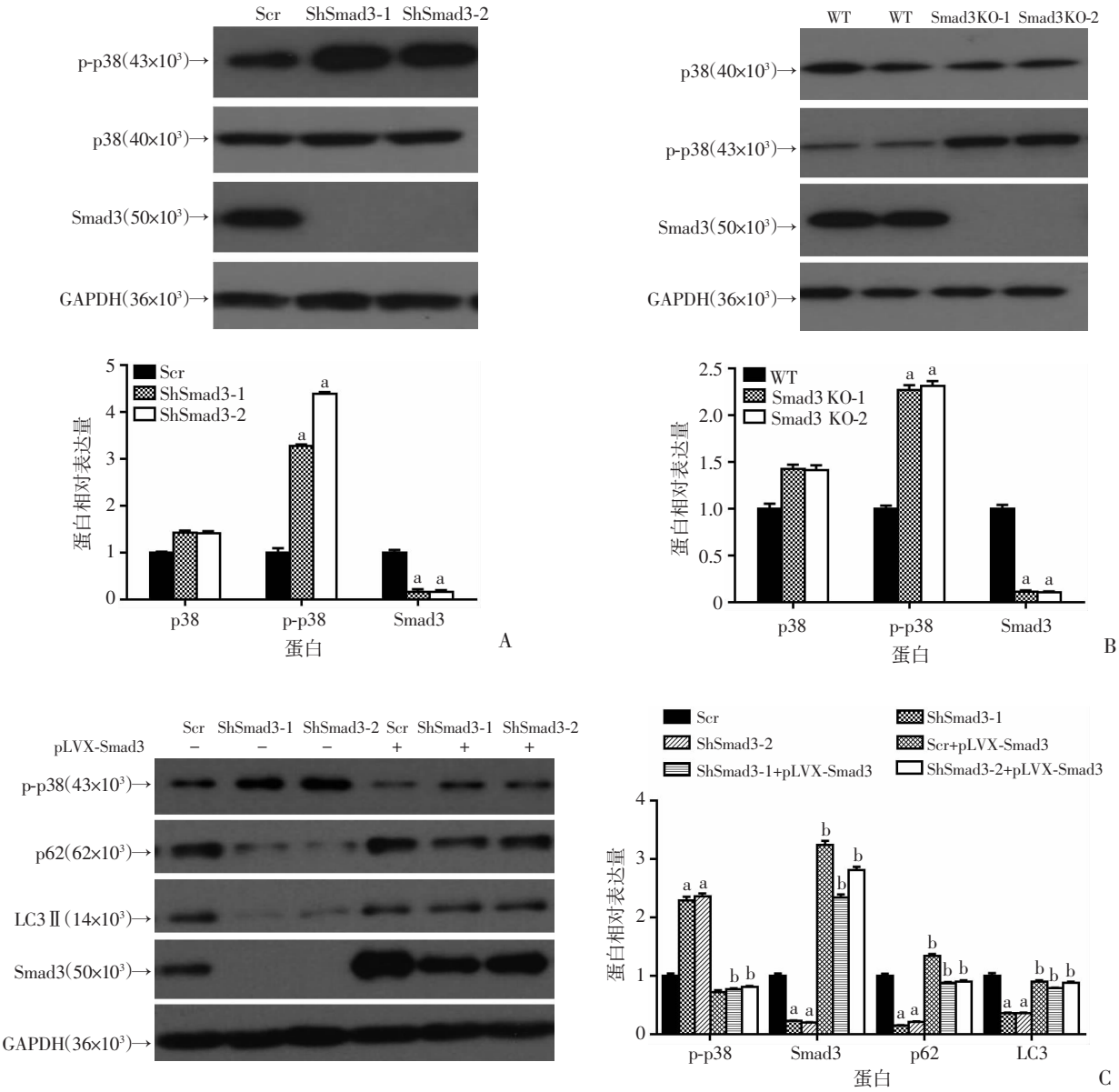
WT:空白对照组;Scr:对照组;Smad3 KO-1、Smad3 KO-2:Smad3 敲除组;ShSmad3-1、ShSmad3-2:Smad3 敲减组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 Smad3 敲减组比较

A:Western blot 检测 Smad3 敲除胰腺癌细胞 LC3、p62 蛋白水平变化;B:Western blot 检测 Smad3 敲减胰腺癌细胞 LC3、p62 蛋白水平变化;C:Western blot 检测 Smad3 敲减胰腺癌细胞以及加 HCQ 后 LC3、p62 蛋白变化

图 5 干预 Smad3 表达后自噬蛋白 LC3、p62 蛋白水平降低

2.6　敲除(敲减)Smad3 后通过 p38/MAPK 通路影响细胞凋亡

Western blot 检测结果显示,与对照组相比,在敲减 Smad3 的 BxPC-3 细胞中 p-p38 显著上调(P<0.05,图 6A),同时在敲除 Smad3 的胰腺癌细胞中 p-p38 蛋白水平也升高(P <0.05,图 6B)。为了进一步证明 Smad3 通过 p38 通路调控自噬诱导细胞凋亡进行了回补实验。外源过表达 Smad3 后发现 LC3、p62 蛋白水平能够回复(P <0.01,图 6C),同时利用 p38 抑制剂 SB203580 处理胰腺癌细胞同样发现 LC3、p62 蛋白水平增加(P<0.01,图 6D)。提示下调 Smad3 后胰腺癌细胞生物学过程的改变,很有可能是通过 p38/MAPK 信号通路。

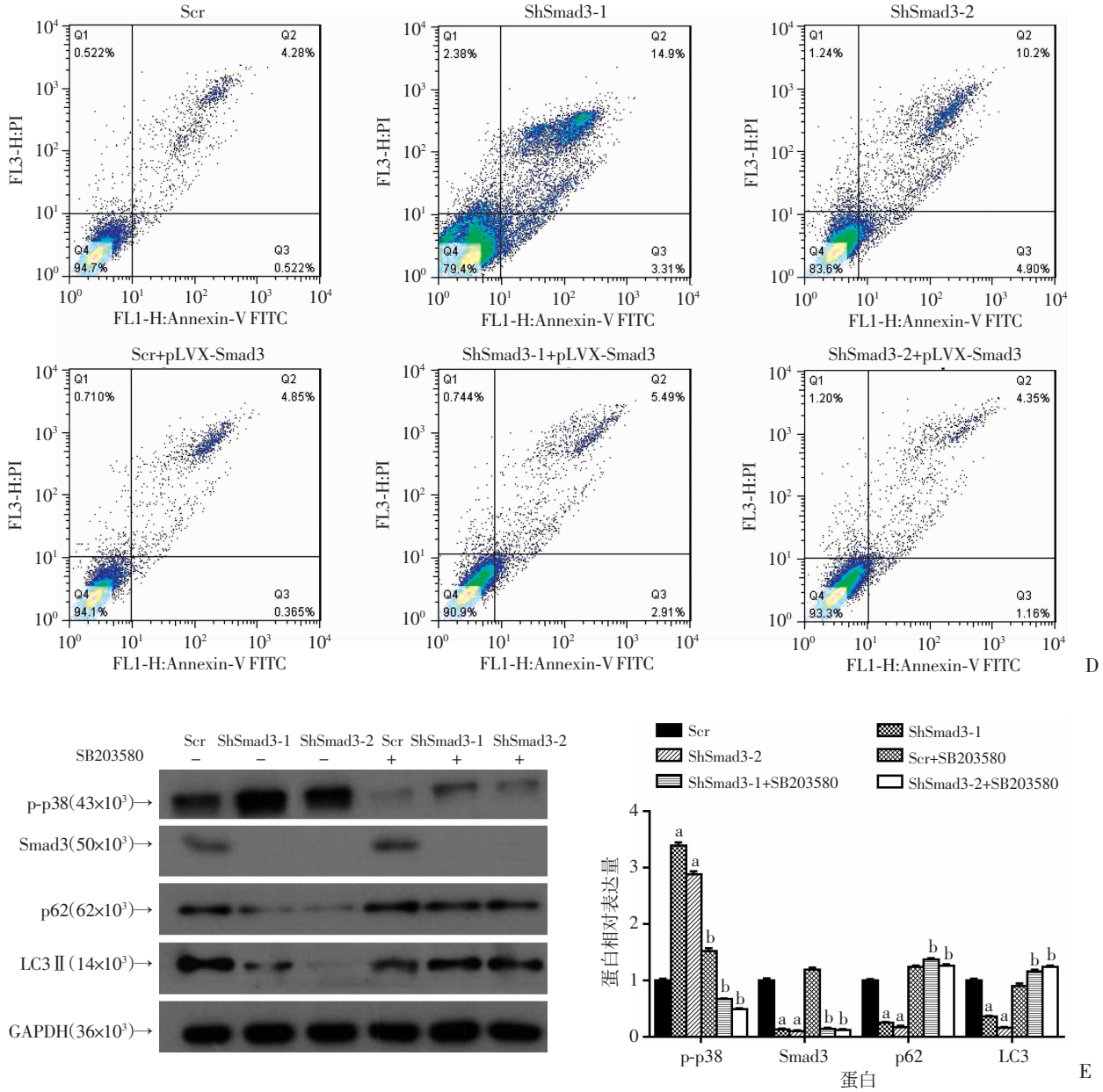


a:P<0.05,与对照组(Scr)比较;b:P<0.01,与 Smad3 敲减组比较

A:Western blot 检测胰腺癌细胞敲减 Smad3 后 p-p38、p38 的蛋白变化;B:Western blot 检测胰腺癌细胞敲除 Smad3 后 p-p38、p38 的蛋白变化;C:Western blot 检测外源过表达 Smad3 后检测 p-p38、LC3、p62 的蛋白变化

图 6　Smad3 通过 MAPK-p38 信号通路影响细胞凋亡与自噬

(图 6D、E 续下页)



a:$P<0.05$,与对照组(Scr)比较;b:$P<0.01$,与 Smad3 敲减组比较

D:流式细胞仪检测外源过表达 Smad3 后胰腺癌细胞凋亡情况变化;E:Western blot 检测 p38 抑制剂 SB203580 及 ShSmad3 慢病毒同时处理胰腺癌细胞 48 h 后 p-p38、LC3、p62 的蛋白变化

续图 6 Smad3 通过 p38/MAPK 信号通路影响细胞凋亡与自噬

3 讨论

胰腺癌是一种恶性消化道肿瘤。由于早期没有特别有效的诊断标志物,一经发现就已进入中晚期,5 年存活率极低。因此,相关的靶向治疗研究亟待开展[22-23]。本研究发现 Smad3 在胰腺癌中高表达且与患者的生存呈负相关,同时敲减 Smad3 后导致胰腺癌细胞凋亡增加。结果提示 Smad3 对胰腺癌发生、发展有重要的调控作用。研究表明植物类黄酮化合物影响 TGF-β1/Smad3 和 TGF-β1/p38 MAPK 信号通路调控自噬,可以减轻肝脏纤维化[24-25],同时发现 Smad3 能促进自噬失调调控细胞溶酶体缺失[26],然而 Smad3 在胰腺癌中调控自噬与凋亡的机制尚不明确。本研究发现干扰 Smad3 通过激活 p38/MAPK 信号通路诱导细胞过度自噬,从而导致其凋亡增加。

自噬是维持细胞稳态的关键机制,也是一种高度

保守的生物学过程。通过对自身蛋白质和细胞器的降解使细胞能够在极端环境下存活[27]。因此,自噬调控受阻将会导致许多疾病的发生[28]。随着研究的深入,发现自噬蛋白 Beclin 1 基因在小鼠和人体中具有肿瘤抑制作用,进一步说明自噬具有肿瘤抑制功能[29]。由于自噬在肿瘤的形成过程中具有双重作用,因此抑制或诱导自噬途径对肿瘤的预防和治疗具有很大优势。本研究发现 Smad3 能够增加自噬相关蛋白 LC3、p62 的表达,具有自噬抑制作用,进而促进胰腺癌的发生、发展。因此,针对 Smad3 的靶向研究将为胰腺癌治疗提供新的思路。

细胞自噬与凋亡存在复杂的作用关系。自噬是细胞凋亡所需的过程,然而过度自噬能够诱导细胞凋亡[30]。p38/MAPK 是调控细胞自噬及凋亡过程的重要信号通路。本研究发现干预 Smad3 的表达,p-p38 蛋白水平显著增加,而自噬蛋白 LC3、p62 下调,同时胰腺癌细胞凋亡也显著增加。结果提示靶向干预 Smad3 后,导致胰腺癌细胞过度自噬,进而诱导胰腺癌细胞凋亡。用 p38 抑制剂 SB203580 处理 Smad3 敲减胰腺癌细胞相关蛋白的变化又能回复,进一步提示可能通过 p38/MAPK 信号通路进行调节。

综上所述,本研究探讨了 Smad3 表达水平与胰腺癌发生、发展以及患者生存的关系,结果表明 Smad3 高表达与胰腺癌的发生、发展正相关,与患者生存负相关。此外,Smad3 在胰腺癌细胞系中高表达,敲减(敲除)Smad3 可明显促进胰腺癌细胞凋亡,且能上调 p-p38 蛋白的表达,同时下调 LC3、p62 的表达。提示 Smad3 在胰腺癌发生、发展中发挥重要的促进作用,为临床治疗胰腺癌提供新的靶点。Smad3 可作为胰腺癌一个潜在的临床诊疗的生物标记物。

参考文献:

[1] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, *et al*. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-385. DOI:10.3322/caac.21565.

[2] ZEESHAN M S, RAMZAN Z. Current controversies and advances in the management of pancreatic adenocarcinoma [J]. World J Gastrointest Oncol, 2021, 13(6): 472-494. DOI:10.4251/wjgo.v13.i6.472.

[3] YANG A N, HERTER-SPRIE G, ZHANG H K, *et al*. Autophagy sustains pancreatic cancer growth through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms[J]. Cancer Discov, 2018, 8(3): 276-287. DOI:10.1158/2159-8290.CD-17-0952.

[4] PENG L, YANG C W, YIN J W, *et al*. TGF-β2 induces Gli1 in a Smad3-dependent manner against cerebral ischemia/reperfusion injury after isoflurane post-conditioning in rats [J]. Front Neurosci, 2019, 13(1): 636. DOI:10.3389/fnins.2019.00636.

[5] ITOH Y, SAITOH M, MIYAZAWA K. Smad3-STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(1): 82-90. DOI:10.1093/abbs/gmx118.

[6] SHENG J Y, WANG L, TANG P M K, *et al*. Smad3 deficiency promotes beta cell proliferation and function in db/db mice *via* restoring Pax6 expression[J]. Theranostics, 2021, 11(6): 2845-2859. DOI:10.7150/thno.51857.

[7] JIANG Z, GUO Y, MIAO L F, *et al*. SMAD3 silencing enhances DNA damage in radiation therapy by interacting with MRE11-RAD50-NBS_1 complex in glioma[J]. J Biochem, 2019, 165(4): 317-322. DOI:10.1093/jb/mvy110.

[8] SEO H Y, LEE S H, LEE J H, *et al*. Clusterin attenuates hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and downregulating the Smad3 signaling pathway[J]. Cells, 2019, 8(11): 1442. DOI:10.3390/cells8111442.

[9] TANG P M K, ZHOU S, MENG X M, *et al*. Smad3 promotes cancer progression by inhibiting $E4BP_4$-mediated NK cell development[J]. Nat Commun, 2017, 8(2): 14677. DOI:10.1038/ncomms14677.

[10] HUANG Y T, CHENG A C, TANG H C, *et al*. USP7 facilitates SMAD3 autoregulation to repress cancer progression in p53-deficient lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 880. DOI:10.1038/s41419-021-04176-8.

[11] MUÑOZ M D, DE LA FUENTE N, SÁNCHEZ-CAPELO A. TGF-β/Smad3 signalling modulates GABA neurotransmission: implications in Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 590. DOI:10.3390/ijms21020590.

[12] FALCICCHIA C, TOZZI F, ARANCIO O, *et al*. Involvement of p38 MAPK in synaptic function and dysfunction[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 5624. DOI:10.3390/ijms21165624.

[13] TIAN X D, TRAUB B, XIE X H, *et al*. Opposing oncogenic functions of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta in human pancreatic cancer cells[J]. Anticancer Res, 2020, 40(10): 5545-5556. DOI:10.21873/anticanres.14567.

[14] SHEN T, HUANG Z H, SHI C F, *et al*. Pancreatic cancer-derived exosomes induce apoptosis of T lymphocytes through

the p38 MAPK-mediated endoplasmic reticulum stress[J]. FASEB J, 2020, 34(6): 8442-8458. DOI:10.1096/fj.201902186R.

[15] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, *et al*. Autophagy in major human diseases[J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863. DOI:10.15252/embj.2021108863.

[16] KOCATURK N M, AKKOC Y, KIG C, *et al*. Autophagy as a molecular target for cancer treatment[J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 134(1): 116-137. DOI:10.1016/j.ejps.2019.04.011.

[17] ONORATI A V, DYCZYNSKI M, OJHA R, *et al*. Targeting autophagy in cancer[J]. Cancer, 2018, 124(16): 3307-3318. DOI:10.1002/cncr.31335.

[18] LI J B, CHEN X, KANG R, *et al*. Regulation and function of autophagy in pancreatic cancer[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3275-3296. DOI:10.1080/15548627.2020.1847462.

[19] YAMAMOTO K, VENIDA A, YANO J, *et al*. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I[J]. Nature, 2020, 581(7806): 100-105. DOI:10.1038/s41586-020-2229-5.

[20] LI W M, ZHU J Q, DOU J, *et al*. Phosphorylation of LAMP2A by p38 MAPK couples ER stress to chaperone-mediated autophagy[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 1763. DOI:10.1038/s41467-017-01609-x.

[21] MODI S, KIR D, BANERJEE S, *et al*. Control of apoptosis in treatment and biology of pancreatic cancer[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(2): 279-288. DOI:10.1002/jcb.25284.

[22] ANSARI D, TINGSTEDT B, ANDERSSON B, *et al*. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow[J]. Future Oncol, 2016, 12(16): 1929-1946. DOI:10.2217/fon-2016-0010.

[23] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, *et al*. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(43): 4846-4861. DOI:10.3748/wjg.v24.i43.4846.

[24] LIU N, FENG J, LU X Y, *et al*. Isorhamnetin inhibits liver fibrosis by reducing autophagy and inhibiting extracellular matrix formation *via* the TGF-β1/Smad3 and TGF-β1/p38 MAPK pathways[J]. Mediators Inflamm, 2019, 2019: 1-14. DOI:10.1155/2019/6175091.

[25] JI J, YU Q, DAI W Q, *et al*. Apigenin alleviates liver fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and autophagy *via* TGF-β1/Smad3 and p38/PPARα pathways[J]. PPAR Res, 2021, 2021: 1-15. DOI:10.1155/2021/6651839.

[26] YANG C, CHEN X C, LI Z H, *et al*. SMAD3 promotes autophagy dysregulation by triggering lysosome depletion in tubular epithelial cells in diabetic nephropathy[J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2325-2344. DOI:10.1080/15548627.2020.1824694.

[27] CAO Q Q, YOU X, XU L J, *et al*. PAQR3 suppresses the growth of non-small cell lung cancer cells *via* modulation of EGFR-mediated autophagy[J]. Autophagy, 2020, 16(7): 1236-1247. DOI:10.1080/15548627.2019.1659654.

[28] DENG S, SHANMUGAM M K, KUMAR A P, *et al*. Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy[J]. Cancer, 2019, 125(8): 1228-1246. DOI:10.1002/cncr.31978.

[29] WANG R C, WEI Y J, AN Z Y, *et al*. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through beclin 1 phosphorylation[J]. Science, 2012, 338(6109): 956-959. DOI:10.1126/science.1225967.

[30] 阚月一, 王娅杰, 李琦, 等. 肿瘤发展过程中自噬与凋亡的相互作用[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 106-112. DOI:10.3969.j.issn.1671-7856.2018.02.019.
KAN Y Y, WANG Y J, LI Q, *et al*. Interaction between autophagy and apoptosis during tumor development[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 106-112. DOI:10.3969.j.issn.1671-7856.2018.02.019.

(**收稿**:2022-05-11;**修回**:2022-07-04)

(编辑 汪勤俭)