DOI:10.16016/j.2097-0927.202310061

透明质酸钠修饰过氧化钙纳米粒子诱导胃癌细胞焦亡

田仪督[1],高生宝[1],贡克文[1],何瑛珏[2],李 洋[2],步雪峰[1] 212000 江苏 镇江,江苏大学附属人民医院:普外科[1],呼吸内科[2]

[**摘要**] **目的** 探讨透明质酸钠修饰过氧化钙纳米粒子(sodium-hyaluronate-modified calcium oxide nanoparticles,SH-CaO_2 NPs)诱导人胃癌细胞焦亡的作用及其可能机制。**方法** 运用透射电镜(transmission electron microscope,TEM)、X射线衍射(X-ray diffraction,XRD)、红外光谱及Zeta电位观测SH-CaO_2 NPs的合成情况;细胞划痕实验验证SH-CaO_2 NPs对人胃癌细胞迁移能力的影响;CCK-8法检测SH-CaO_2 NPs对胃癌细胞增殖活性的影响以及使用Nod样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3,NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(cysteinyl aspartate specific proteinase,Caspase-1)抑制剂预处理后胃癌细胞的增殖活性;DCFH-DA荧光探针及流式细胞仪检测细胞内活性氧的表达量;免疫荧光法及Western blot检测各组细胞NLRP3、Caspase-1、GSDMD蛋白表达水平。**结果** TEM、XRD、红外光谱及Zeta电位观测结果提示SH-CaO_2 NPs成功制备。CCK-8法及细胞划痕实验显示,SH-CaO_2 NPs作用于人胃癌细胞24 h后,胃癌细胞生长明显受到抑制($P<0.001$)。ROS荧光及流式细胞仪结果显示,SH-CaO_2 NPs作用于人胃癌细胞24 h后肿瘤细胞内ROS含量升高($P<0.001$),予以ROS抑制剂(NAC)后细胞内NLRP3蛋白含量升高,Caspase-1、GSDMD剪切体即活性片段表达量上升($P<0.001$),予以NLRP3、Caspase-1抑制剂可逆转此过程。**结论** SH-CaO_2 NPs可抑制人胃癌细胞活力,可能通过激活ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路介导炎症反应和细胞焦亡。

[**关键词**] 胃癌;纳米粒子;焦亡;Nod样受体蛋白3;Caspase-1

[**中图法分类号**] R730.23;R735.2;R914.2 [**文献标志码**] A

Sodium-hyaluronate-modified calcium peroxide nanoparticles induce pyroptosis in gastric cancer cells *in vitro*

TIAN Yidu[1], GAO Shengbao[1], GONG Kewen[1], HE Yingjue[1], LI Yang[1], BU Xuefeng[2] [1]Department of General Surgery, [2]Department of Respiratory Medicine, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu Province, 212000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of sodium-hyaluronate-modified calcium peroxide nanoparticles (SH-CaO_2 NPs) in inducing pyroptosis in human gastric cancer cells and its possible mechanisms. **Methods** Transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy, and zeta potential test were used to confirm the synthesis of SH-CaO_2 NPs. Cell scratch assay and CCK-8 assay were employed to observe the impacts of SH-CaO_2 NPs on the migration and proliferation of human gastric cancer cell line HGC-27. The generation of reactive oxygen species (ROS) was observed with confocal laser scanning microscopy (CLSM) and quantified with flow cytometry in the cells after SH-CaO_2 NPs treatment or with pretreatment with ROS inhibitor NAC. Furthermore, the effects of pretreatment of NLRP3 inhibitor (MCC950) and Caspase-1 inhibitor (VX765) on the proliferative activity and on expression of their own and their downstream GSDMD in HGC-27 cells were also investigated with CCK-8 assay,

[**基金项目**] 镇江市科技创新资金项目(SH2023004)

[**通信作者**] 步雪峰,E-mail:xuefengbu05@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

immunofluorescence assay and Western blotting. **Results** TEM images, XRD, infrared spectroscopy, and zeta potential test confirmed the successful preparation of SH-CaO_2 NPs. Cell scratch assay and CCK-8 assay showed that application of SH-CaO_2 NPs for 24 h significantly inhibited the proliferation of HGC-27 cells ($P<0.001$), while, CLSM and flow cytometry indicated the treatment also promoted the production of ROS ($P<0.001$). Pretreatment of ROS inhibitor NAC resulted in up-regulation of NLRP3, and increased expression levels of cleaved Caspase-1 and N-terminal fragment of GSDMD ($P<0.001$), while pretreatment of both NLRP3 inhibitor and Caspase-1 inhibitor could reverse the process. **Conclusion** SH-CaO_2 NPs inhibit cell viability of human gastric cancer, which may mediate the inflammatory response and pyroptosis by activating the ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway.

[**Key words**] gastric cancer; nanoparticles; pyroptosis; NOD-like receptor protein 3; Caspase-1

Supported by the Science and Technology Innovation Fund of Zhenjiang City (SH2023004). Corresponding author: BU Xuefeng, E-mail: xuefengbu05@163.com

胃癌是常见的消化道肿瘤,其发生发展受多种因素的影响,包括环境因素和遗传因素[1]。依据其解剖部位和组织病理学类型进行分类,临床上近96%的胃癌病理类型为腺癌。胃癌被确诊时常为晚期,患者预后较差。目前,对大多数胃癌患者的治疗方式以手术治疗为主,而在非手术治疗方面,全身治疗可改善晚期或发生局部转移的胃癌患者的生存率,并提高其生活质量[2]。目前,多数化疗药物的作用机制是通过诱导胃癌细胞发生凋亡以抑制胃癌的生长,但肿瘤细胞也可能出现"癌基因成瘾"现象,使胃癌细胞对化疗药物产生耐药性,从而导致治疗失败。因此,有必要探索新的诱导非凋亡形式的细胞死亡途径,以抑制胃癌细胞的进展及改善胃癌的预后。

焦亡是一种炎症性程序性细胞死亡途径,通常由微生物感染引起[3],其特点是细胞膜迅速破裂及释放促炎细胞内容物。研究发现,核苷酸结合结构域样受体(NOD like receptor,NLR)家族 pyrin 域蛋白 3(NLRP3)激活炎性小体,可引发细胞焦亡[4-5]。NLRP3 炎性小体的组装引起 Caspase-1 裂解激活,从而切割 gasdermin D(GSDMD)蛋白,将其分裂成 C 端和有活性的 N 端[6],而后者将自组装于细胞膜上形成孔洞,使细胞内外渗透压平衡被破坏,导致细胞内容物释放到细胞外。在此过程中活化的 Caspase-1 会促进包括 IL-1β、IL-18 在内的促炎性细胞因子的成熟,并将后者通过孔洞释放到细胞外引发进一步细胞焦亡进程[7]。焦亡具有肿瘤抑制功能,可增强局部和全身抗肿瘤免疫能力[8-9]。因此,寻找安全有效、可转化为临床应用的焦亡激活剂具有重要意义。

纳米粒子(nanoparticles,NPs)通常在多功能、多模态成像和药物递送载体中发挥重要作用[10]。在最近10年中,NPs 已成为设计新治疗策略的候选方法[11]。肿瘤纳米治疗药物与传统抗癌药物相比,纳米材料在生物非特异性分布、溶解度、生物利用度方面具有明显的优势[12]。透明质酸钠修饰过氧化钙纳米颗粒(sodium-hyaluronate-modified calcium oxide nanoparticles, SH-CaO_2 NPs)触发的程序性细胞焦亡在动物体内外都增强了抗癌药物的疗效,并能有效抑制胃癌的生长和转移[13]。本研究通过观察 SH-CaO_2 NPs 的合成情况及其对胃癌细胞活性、细胞内焦亡相关蛋白表达的影响,探讨 SH-CaO_2 NPs 诱导胃癌细胞发生焦亡的机制,以期为寻找安全有效的可用于胃癌治疗的纳米药物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 SH-CaO_2 NPs 的制备

制备前,取 0.50 mg/mL 透明质酸钠水溶液和 2 mol/L(0.22 g/mL)氯化钙水溶液作为储备液。将 1 mL 的透明质酸钠和 1 mL 的氯化钙依次加入到 60 mL 的经强力搅拌的无水甲醇中。上述溶液搅拌均匀后,加入 1 mol/L 的氨水 1.11 mL,再次搅拌均匀后,将 1.11 mL 30%的双氧水滴入(搅拌速度 500 r/min,滴加速度 0.25 mL/min)。当颜色变成剑桥蓝时,将混合物离心,用乙醇洗涤 2 次,最后分散在去离子水中。

1.2 SH-CaO_2 NPs 的表征

利用场发射透射电子显微镜(JEM-2100F,200 kV)获得透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)图像。采用 Rigaku D/MAX-2250V 衍射仪获得 X 射线衍射(X-ray diffraction,XRD)图谱。利用 Bruker 张量Ⅱ型红外光谱仪获得傅里叶变换红外光谱(Fourier-transform infrared spectroscopy,FT-IR)。使用 Zetasizer Nano S90(英国马尔文公司)获得 Zeta 电位信息。CCK-8 检测用 Spark™ 多模式酶标仪进行。

1.3 细胞和试剂

人胃癌细胞株 HGC-27 购自无锡菩禾生物公司;胎牛血清(FBS)、RPMI 1640 培养液、胰蛋白酶购自英国 Gibico 公司;多聚甲醛购自上海碧云天公司;RIPA

裂解缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝公司;SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒购自上海雅酶公司;PVDF 膜购自美国 Invitrogen 公司;青/链霉素/庆大霉素、快速封闭液购自武汉塞维尔公司;NLRP3、Caspase 1/P20/P10 Antibody、GSDMD 购自武汉三鹰公司;羊抗兔 IgG H+L (HRP)、羊抗鼠 IgG H+L(HRP)、CY3 标记的抗兔 IgG 购自北京博士德公司;增强型化学发光试剂(ECL)购自陕西白鲨公司;氯化钙、透明质酸钠、无水甲醇、无水乙醇、氨水、过氧化氢购自上海麦克林公司;NAC、VX765 购自美国 MedChemExpress 公司;MCC950 购自美国 Selleck 公司;2,7-二氯荧光素二醋酸酯(DCFH-DA)购自江苏凯基生物公司;Hoechest33342 购自上海碧云天公司。

1.4 细胞培养

从-80 ℃恒温冰箱中取出装有 HGC-27 细胞的冻存管,迅速投入 37 ℃恒温水浴箱中解冻。将含有 10%FBS、1%青/链霉素/庆大霉素的 RPMI1640 培养液 1 mL 加入冻存细胞液中,1 500 r/min 离心 5 min,去除上清液,再用培养液混匀细胞后转移至细胞培养瓶中,放置在 37 ℃恒温,5%CO_2 的培养箱中培养。

1.5 细胞划痕实验

将 HGC-27 细胞常规消化后,以 1×10^6 个/孔铺到 6 孔板内,过夜培养至细胞基本融合。用 10 μL 微量移液头在 6 孔板内进行划痕,PBS 冲洗 3 次后,加入无血清培养基继续培养,用倒置显微镜于 0、24 h 分别在同一观察位置进行拍照,采用 Image J 软件进行测量分析,计算细胞迁移率。公式如下:细胞迁移率(%) = (0 h 划痕面积-24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积×100%。

1.6 细胞毒性检测

将 HGC-27 细胞以 2 000 个/孔接种于 96 孔板中,在 37 ℃下孵育过夜。细胞贴壁后,用含不同浓度 SH-CaO_2 NPs(0、10、20、40、80、160 μg/mL)的完全培养基培养 24 h,加入 10 μL 的 CCK-8 溶液处理 1.5 h。随后测量每孔的光密度值[D(450)],获得细胞存活率。采用 80 μg/mL 的 SH-CaO_2 NPs 浓度培养不同时间(0、12、24、48、72 h)后,测定胃癌细胞存活率。检测使用 ROS 抑制剂(NAC)、NLRP3 抑制剂(MCC950)、Caspase-1 抑制剂(VX765)预处理的胃癌细胞与 SH-CaO_2 NPs 共孵育后的细胞活力,分为空白(NC)组、抑制剂组、SH-CaO_2 NPs 组及 SH-CaO_2 NPs+抑制剂组。

1.7 活性氧检测

用荧光探针 DCFH-DA 检测过量活性氧的产生。将 HGC-27 细胞接种到玻璃底细胞培养皿的 20 mm 孔中,将其分为 3 组,即 NC 组(完全培养基 RPMI1640)、SH-CaO_2 NPs 组(80 μg/mL,分散在 RPMI1640 中)以及 SH-CaO_2 NPs+NAC 组(SH-CaO_2 NPs 80 μg/mL,NAC 10 mmol/L),在 37 ℃下孵育 24 h。去除培养基后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,并向其中加入 300 μL 的 DCFH-DA(10 μmol/L)。在黑暗中共孵育 30 min 后,取出探针并冲洗掉;然后在甲醇固定细胞前进行细胞核染色,用共聚焦激光扫描显微镜成像(confocal laser scanning microscope,CLSM)观察产生的活性氧,并用流式细胞仪检测细胞内活性氧含量。

1.8 Western blot 检测

用 RIPA 缓冲液裂解提取总蛋白,用 BCA 蛋白法测定浓度。用 TBST 稀释相关抗体,NLRP3 (1∶4 000)、Caspase-1/P20/P10 Antibody (1∶4 000)、GSDMD (1∶4 000)。用 5% 的脱脂牛奶封住聚偏氟乙烯(PVDF)膜后,将其孵育过夜以检测蛋白质。然后与相应的酶标山羊抗兔在室温下孵育 1 h。TBST 洗净后用 ECL 检测试剂检测蛋白条带,用 Tanon-5200 系统(北京原平好生物技术有限公司)拍照。

1.9 免疫荧光实验

对人胃癌细胞进行共聚焦成像,将细胞以 13×10^5 个/孔接种在 24 孔玻璃底板中。予以 NAC、MCC950、VX765 预处理细胞,并在实验组中加入 SH-CaO_2 NPs 处理,将细胞用 PBS 洗涤 2 次,用冷的 4% 多聚甲醛 200 μL 固定 30 min,使用 2% BSA 中的 0.1% Triton X-100 透化 10 min,在室温下用 5%BSA 封闭 1 h,然后与 1∶100 稀释的一抗在 4 ℃下孵育过夜,使用 CY3 标记的抗兔 IgG 二抗孵育 1 h。滴加 Hoechest33342 复染细胞核 10 min 后,用 PBS 洗 4 次,每次 5 min。随后在 CLSM 上获取细胞图像。

1.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。计量资料进行正态性检验,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验和单因素方差分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

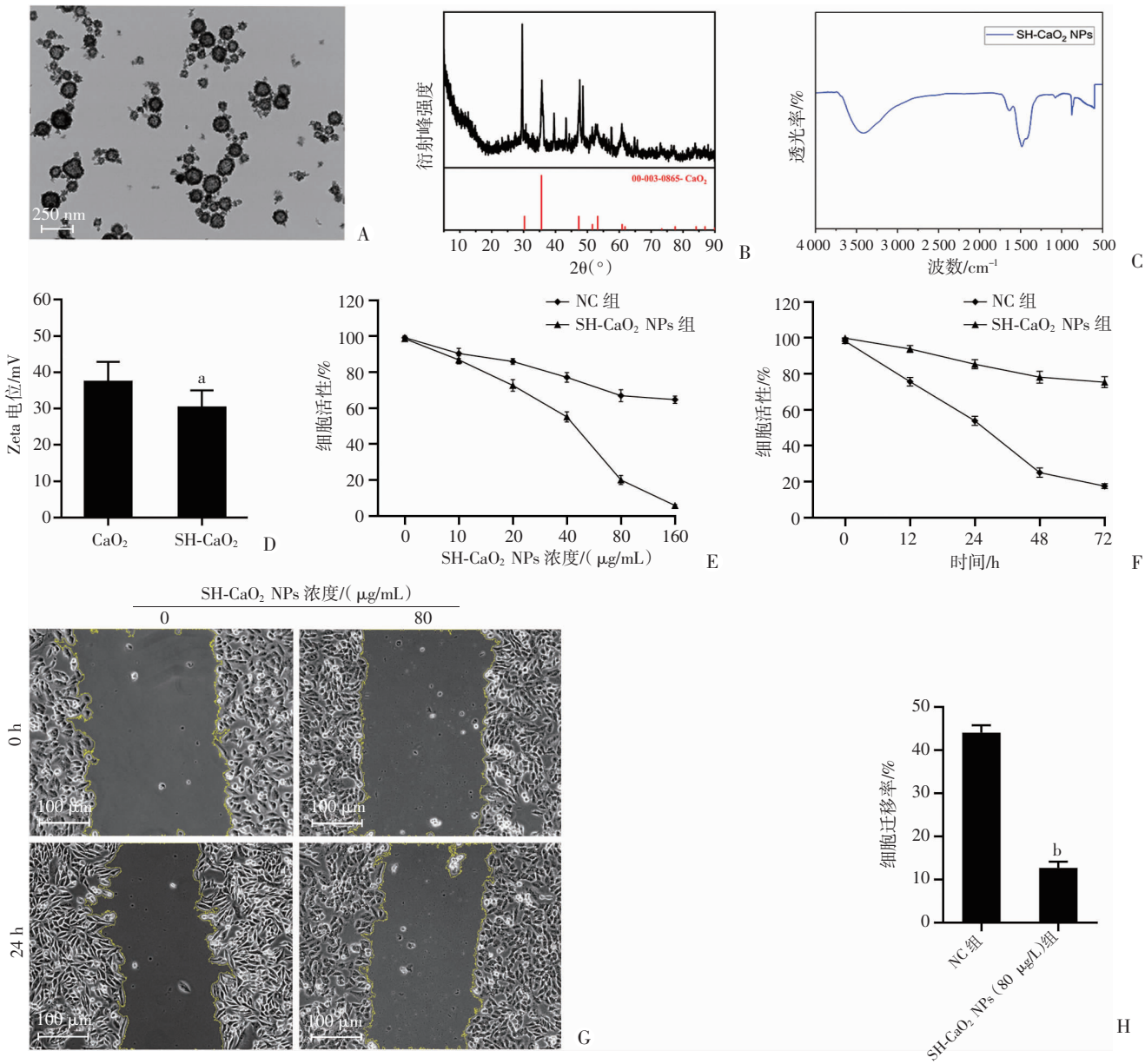
2.1 SH-CaO_2 NPs 的构建与鉴定

在甲醇-水体系中,采用湿化学方法,室温下制备透明质酸钠修饰过氧化钙纳米粒子。TEM 图像显示,得到的 NPs 具有良好的结晶度(图 1A),在制备过程中可通过改变混合物的碱度来调节纳米粒子的粒径大小及分散度。XRD 表征证实,所得产物的衍射峰与四方 CaO_2 标准卡(PDF#03-0865)的衍射峰一致(图 1B),予以红外光谱检测进一步验证,表明 CaO_2 NPs

成功形成(图 1C)。进一步使用 Zeta 电位检测,发现透明质酸钠处理后 Zeta 电位下降约 7 mV(P<0.01,图 1D),表明透明质酸钠对过氧化钙纳米粒子成功改性。

2.2 SH-CaO_2 NPs 抑制胃癌细胞增殖活性

CCK-8 法检测在不同浓度的 SH-CaO_2 NPs 作用下 HGC-27 细胞存活率的变化。予以药物作用 24 h,随着 SH-CaO_2 NPs 浓度的增加,HGC-27 细胞的存活率明显降低(P<0.001,图 1E)。结合细胞死亡率数据,选用 80 μmol/L 作为后续 SH-CaO_2 NPs 的实验浓度。并以此浓度进行时间梯度细胞活性检测,提示随着时间的增加胃癌细胞活性逐渐减弱(P<0.001,图 1F)。细胞划痕实验结果显示,与 NC 组比较,使用最适浓度的 SH-CaO_2 NPs 干预后,HGC-27 细胞的生长和迁移出现延迟(图 1G、H)。



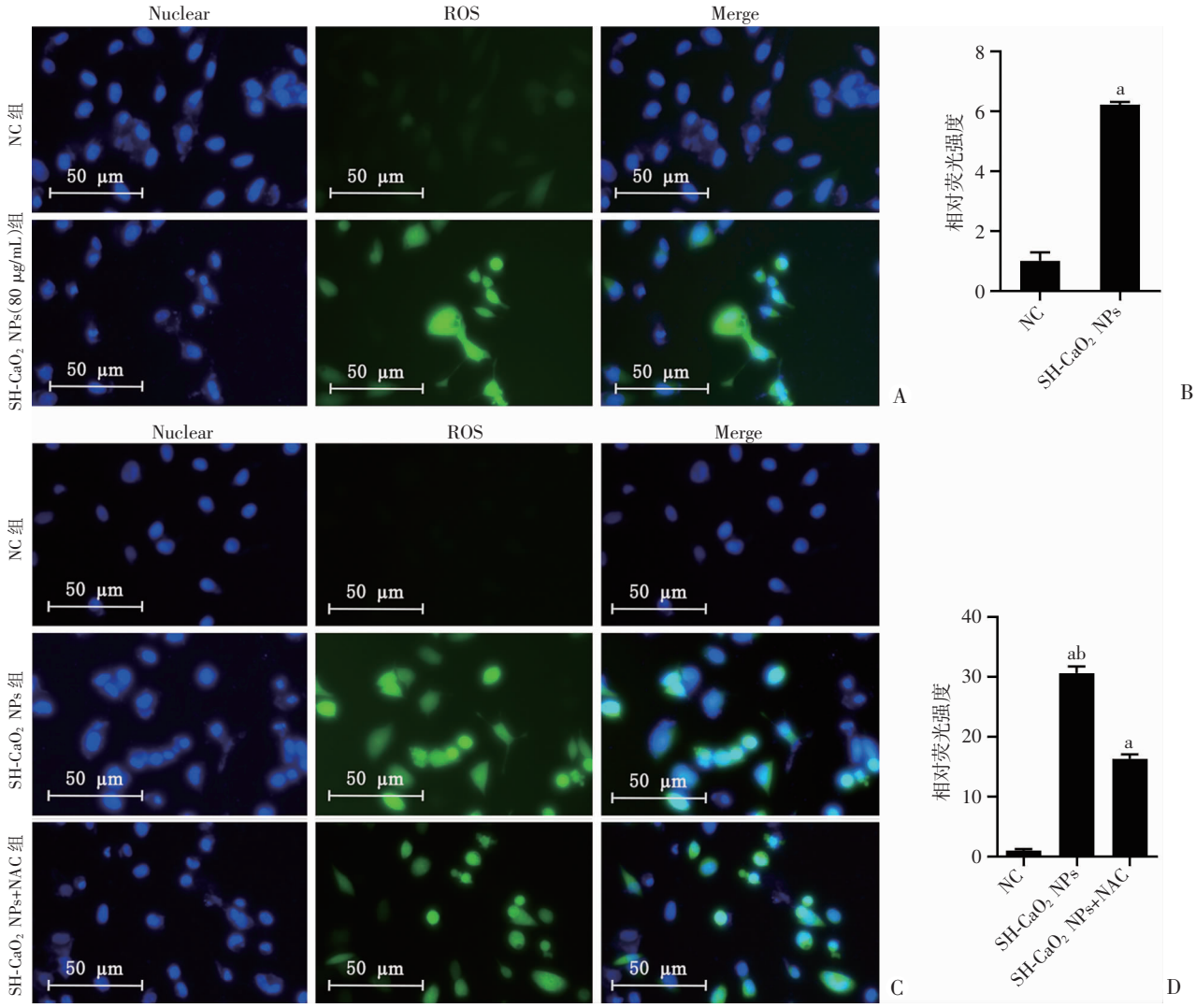
a:P<0.01,与 CaO_2 组比较;b:P<0.001,与 NC 组比较

A:电镜观察 SH-CaO_2 NPs 形态;B:SH-CaO_2 NPs 的 XRD 检测;C:SH-CaO_2 NPs 傅里叶红外光谱检测;D:CaO_2 NPs 和 SH-CaO_2 NPs 的 Zeta 电位(n=4);E:不同 SH-CaO_2 NPs 浓度作用 24 h 后细胞活性变化(n=3);F:相同 SH-CaO_2 NPs 浓度作用不同时间后细胞活性变化(n=3);G、H:划痕实验观察 SH-CaO_2 NPs 作用 24 h 后细胞划痕愈合情况及细胞愈合率分析

图 1 SH-CaO_2 NPs 的一般特性以及其抑制胃癌细胞增殖活性的能力($\bar{x}\pm s$)

2.3　$SH\text{-}CaO_2$ NPs 增加胃癌细胞内 ROS 含量,诱导细胞焦亡并被 NAC 抑制

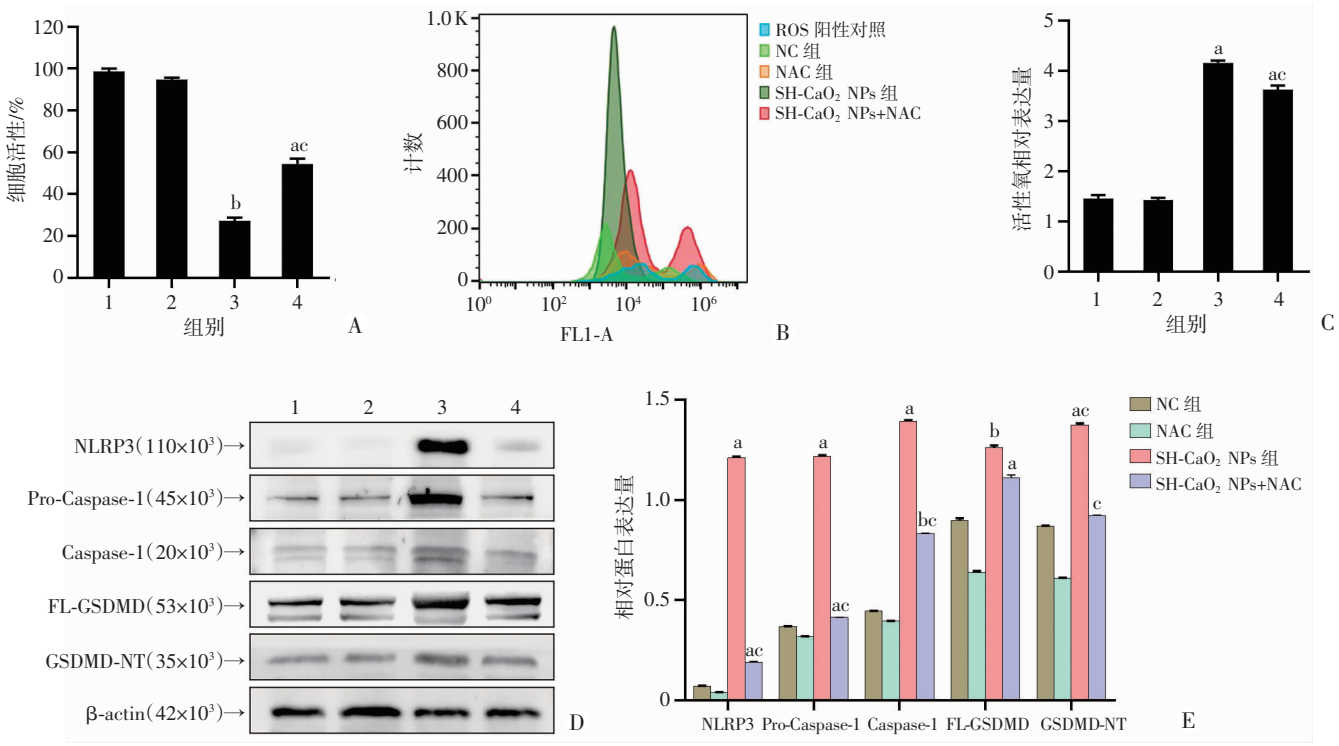
采用 DCFH-DA 荧光探针检测 $SH\text{-}CaO_2$ NPs(80 μg/mL)作用 24 h 后细胞内的 ROS 水平,可见胃癌细胞内的 ROS 水平显著增加($P<0.001$,图 2A、B)。使用 NAC 10 mmol/L 预处理 1 h 后加入 $SH\text{-}CaO_2$ NPs(80 μg/mL)作用 24 h,DCFH-DA 荧光探针检测实验($P<0.001$,图 2C、D)以及流式细胞仪检测($P<0.001$,图 3B、C)表明,与 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 比较,NAC 预处理能有效抑制 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 诱导的细胞内 ROS 上调。随后运用 CCK-8 法验证,与单独加入 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 相比,使用 NAC 预处理减少了细胞的死亡率($P<0.001$,图 3A)。进一步验证了 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 诱导的细胞内 ROS 上调是诱导胃癌细胞发生焦亡的重要原因。Western blot 检测结果显示,与 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 组比较,NAC 预处理显著抑制 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 诱导的细胞内 NLRP3 含量增加以及 Caspase-1、GSDMD 的激活($P<0.001$,图 3D、E)。上述结果表明 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 诱导的细胞内 ROS 形成及积聚是进一步激活 NLRP3、促使炎症小体形成、引起胃癌细胞焦亡的关键因素。



a:$P<0.001$,与 NC 组比较;b:$P<0.001$,与 $SH\text{-}CaO_2$ NPs+NAC 组比较

A、B:$SH\text{-}CaO_2$ NPs 处理 24 h 后细胞内 ROS 荧光表达及定量分析;C、D:NAC 预处理后 $SH\text{-}CaO_2$ NPs 作用 24 h 细胞内 ROS 荧光表达及定量分析

图 2　$SH\text{-}CaO_2$ NPs 对 HGC-27 细胞内 ROS 含量以及焦亡通路蛋白含量的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1:NC 组;2:NAC 组;3:SH-CaO_2 NPs 组;4:SH-CaO_2 NPs+NAC 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NC 组比较;c:$P<0.001$,与 SH-CaO_2 NPs 组比较

A:NAC 预处理后 SH-CaO_2 NPs 作用 24 h 各组细胞活性变化;B、C:流式细胞仪检测 NAC 预处理后 SH-CaO_2 NPs 作用 24 h 细胞内 ROS 水平及定量分析;D、E:Western blot 检测 NAC 预处理后 SH-CaO_2 NPs 作用 24 h 焦亡通路相关蛋白表达及定量分析结果

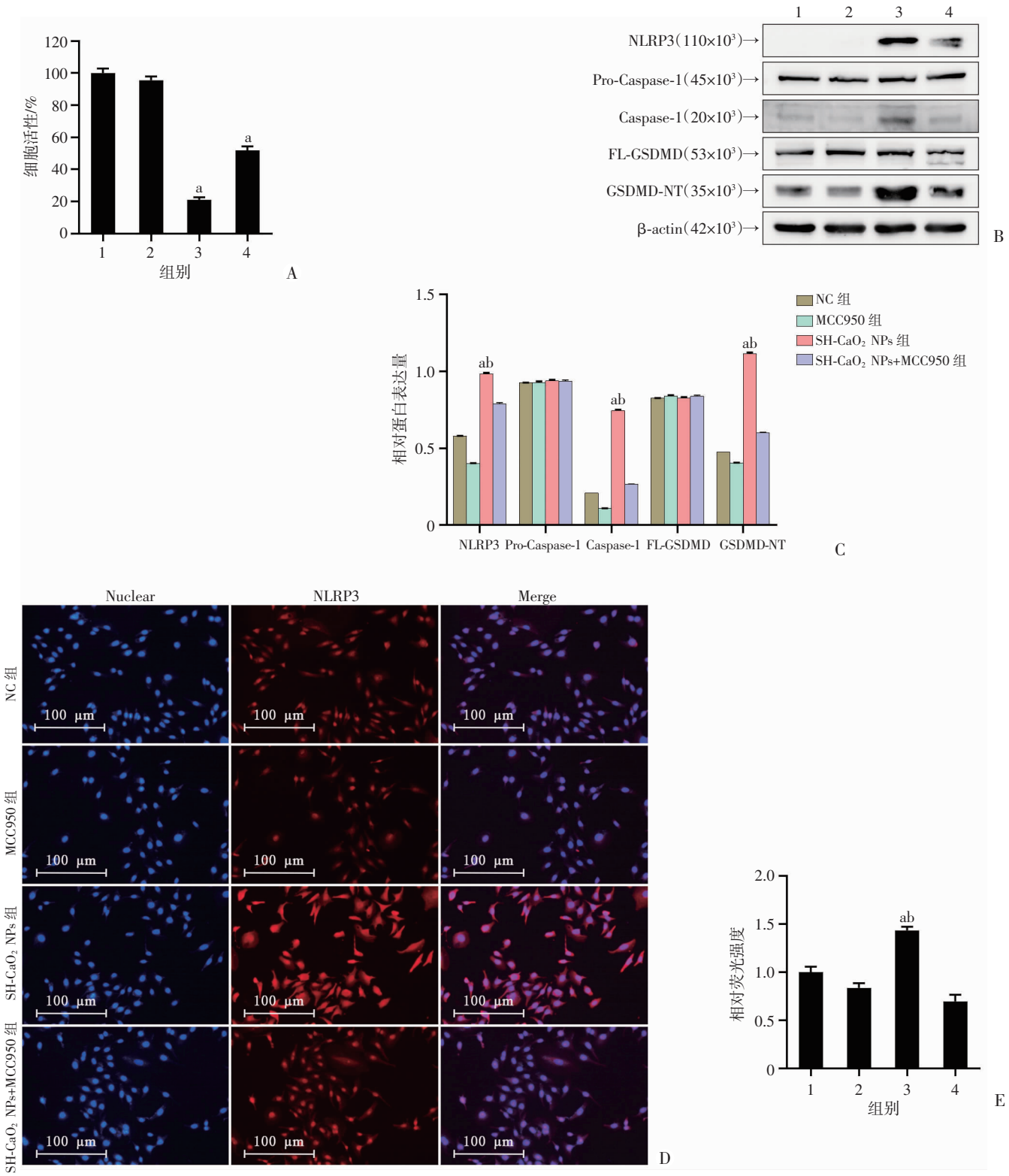
图 3 SH-CaO_2 NPs 对 HGC-27 细胞内 ROS 含量以及焦亡通路蛋白含量的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.4 SH-CaO_2 NPs 通过 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路诱导胃癌细胞焦亡

使用 NLRP3 的特异性抑制剂 MCC950(10 μmol/L)进行预处理,然后加入 SH-CaO_2 NPs 作用 24 h。CCK-8 法检测结果显示,使用 MCC950 预处理后胃癌细胞死亡率降低($P<0.001$,图 4A)。Western blot 检测结果显示 MCC950 成功抑制 SH-CaO_2 NPs 诱导的 NLRP3 上调以及下游焦亡通路的激活(图 4B、C)。免疫荧光观测结果显示,SH-CaO_2 NPs 处理后细胞内 NLRP3 荧光表达量显著增加,而此现象会被 MCC950 抑制($P<0.001$,图 4D、E)。结果证实 SH-CaO_2 NPs 可以通过增加 NLRP3 的含量以激活炎性小体诱导胃癌细胞发生细胞焦亡。

使用 Caspase-1 的特异性抑制剂 VX765(10 μmol/L)提前 1 h 预处理胃癌细胞,随后加入 SH-CaO_2 NPs(80 μg/mL)继续作用 24 h。CCK-8 法检测结果显示,使用 VX765 预处理 1 h 降低 SH-CaO_2 NPs 诱导的 HGC-27 细胞的死亡率($P<0.001$,图 5A)。Western blot 检测结果显示,VX765 能抑制 SH-CaO_2 NPs 在细胞中引发的 Caspase-1、GSDMD 剪切体即活性片段表达量的上升(图 5B、C)。免疫荧光观测结果显示,SH-CaO_2 NPs 处理后细胞内 Caspase-1 的荧光表达量明显增加,而在此基础上使用 VX765 后观察到 Caspase-1 荧光表达量减少($P<0.001$,图 5D、E)。以上结果表明,Caspase-1 的激活可能在 SH-CaO_2 NPs 引起的胃癌细胞焦亡中发挥重要的作用。

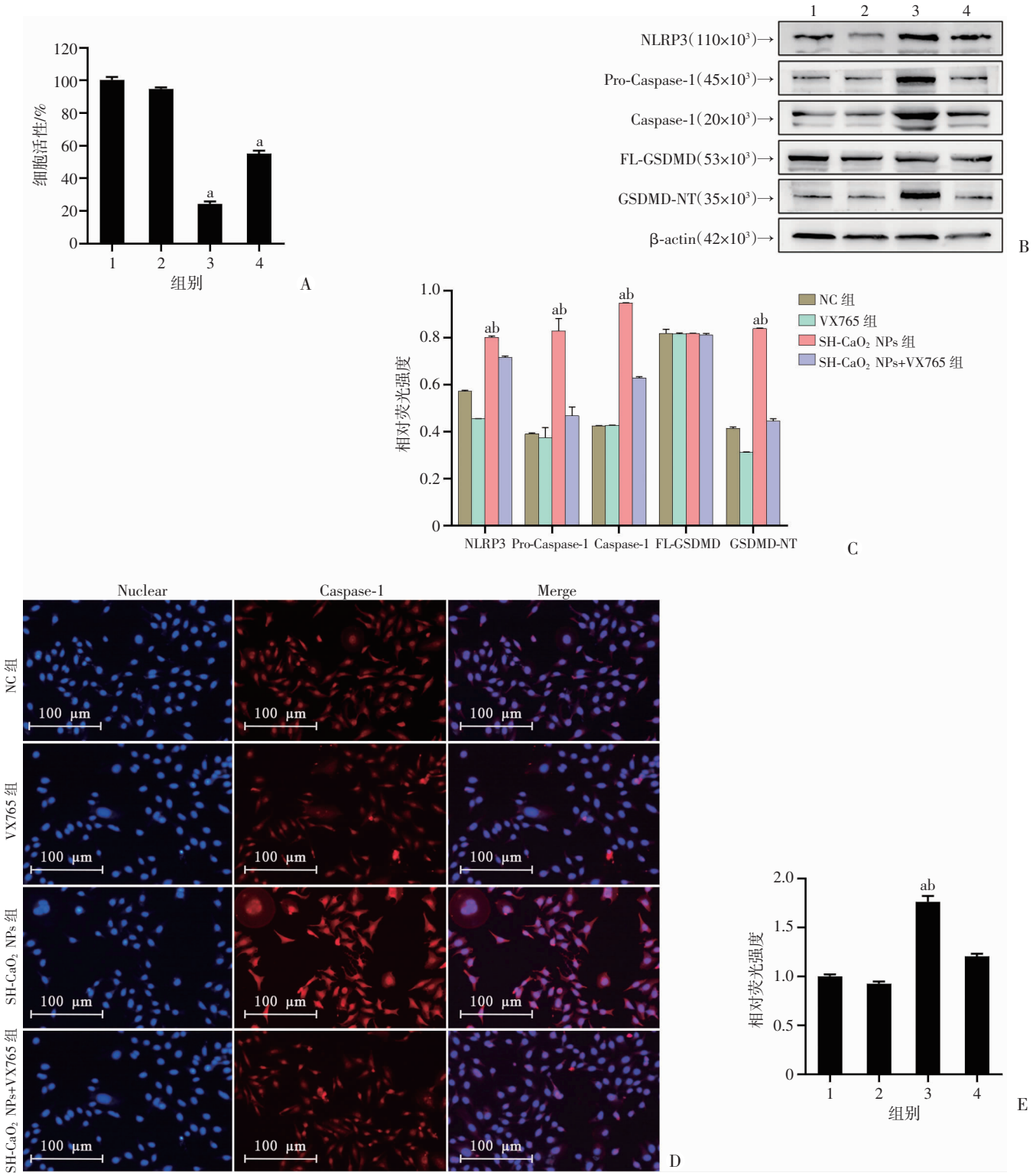
以上结果证实,SH-CaO_2 NPs 作用人胃癌细胞后 GSDMD 的含量增加,且当使用 GSDMD 上游蛋白 NLRP3、Caspase-1 特异性抑制剂 MCC950、VX765 预处理后可逆转此过程。以此说明 GSDMD 在焦亡中的有重要作用。进一步验证了 SH-CaO_2 NPs 是通过诱导胃癌细胞内 ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路的激活介导肿瘤炎症反应和细胞焦亡的发生。



1:NC 组;2:MCC950 组;3:SH-CaO_2 NPs 组;4:SH-CaO_2 NPs+MCC950 组;a:$P<0.001$,与 NC 组比较;b:$P<0.001$,与 SH-CaO_2 NPs+MCC950 组比较

A:各组细胞活性比较;B、C:予以 MCC950 预处理,SH-CaO_2 NPs 作用 24 h 后 Western blot 检测及定量结果;D、E:予以 SH-CaO_2 NPs 及 MCC950 处理 24 h 后各组免疫荧光检测及定量结果

图 4 SH-CaO_2 NPs 处理后对焦亡经典通路中 NLRP3 的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



1:NC 组;2:VX765 组;3:SH-CaO_2 NPs 组;4:SH-CaO_2 NPs+VX765 组;a:$P<0.001$,与 NC 组比较;b:$P<0.01$,与 SH-CaO_2 NPs+VX765 组比较

A:VX765 预处理后,SH-CaO_2 NPs 作用 HGC-27 细胞的细胞活性;B、C:予以 VX765 预处理,SH-CaO_2 NPs 作用 24 h 后 Western blot 检测及定量结果;D、E:予以 SH-CaO_2 NPs 及 VX765 处理 24 h 后各组免疫荧光检测及定量结果

图 5 SH-CaO_2 NPs 处理后对焦亡通路中 Caspase-1 的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

3 讨论

胃癌是目前临床上常见的消化道恶性肿瘤,已成为世界癌症相关死亡的第3大原因,严重威胁着公众健康[14]。虽然胃癌的诊断和治疗已经取得了很大的成就,且目前绝大多数早期胃癌可通过手术以及术后新辅助化疗达到治愈水平。然而,随着晚期胃癌患者逐渐年轻化、肿瘤耐药性不断提高,频繁出现的放化疗等辅助治疗耐受问题在很大程度上限制了胃癌的临床治疗效果,导致其总生存率仍然很低[15]。因此,迫切需要阐明和加深研究胃癌的潜在发展机制,并开发更多的治疗靶点,而纳米粒子是改善当前胃癌预后和治疗选择的一种潜在策略[16]。焦亡是一种细胞程序性死亡的促炎方式,其特征是形成孔隙、细胞肿胀伴有大气泡,并快速释放肿瘤特异性抗原,在体内已被证明具有高效的抗肿瘤免疫功能。因此,为了克服传统微分子焦亡药物的耐药性和严重的副作用,开发更先进的纳米药物以强力诱导焦亡是必要的。在已被报道的纳米平台上,纳米粒子通过释放相关离子及过氧化物来实现焦亡诱导,导致离子突然激增,细胞内活性氧含量显著升高,从而激活Caspase-1/GSDMD依赖的焦亡途径[17]。本研究发现,SH-CaO_2 NPs可通过ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD信号通路诱导胃癌发生细胞焦亡,影响肿瘤进展。

许多纳米粒子在肿瘤的治疗方面展现出良好的效果,其主要的作用机制是氧化应激、细胞毒性和炎症[18]。SH-CaO_2 NPs是使用室温快速湿化学法合成的纳米材料,在抑制乳腺癌、胃肠癌进展的机制研究中均显现出较好的抗肿瘤作用。利用pH敏感性的SH-CaO_2 NPs进行抗肿瘤治疗是一种高效策略。SH-CaO_2 NPs在肿瘤缺氧酸性微环境中会缓慢分解产生H_2O_2[19],导致细胞内氧化应激的发生,同时过氧化氢酶在胃癌中含量降低[20],氧化应激的持续作用将导致胃癌细胞内活性氧不可控的积累。这些NPs在肿瘤细胞中触发细胞毒性ROS的产生,最终诱导胃癌细胞焦亡[21]。值得注意的是,NPs的杀伤作用对正常细胞的不良影响较肿瘤细胞更小[22]。本研究通过体外实验,证实SH-CaO_2 NPs通过激活ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD依赖的经典焦亡途径诱导胃癌细胞死亡。为验证SH-CaO_2 NPs诱导胃癌细胞发生焦亡与细胞内ROS的聚集是否存在联系,本研究检测了SH-CaO_2 NPs作用的胃癌细胞中ROS的含量,发现药物作用后细胞内的ROS水平显著升高。而使用ROS抑制剂NAC进行预处理,运用ROS荧光检测及流式细胞分析结果显示,与单纯加入SH-CaO_2 NPs的细胞相比,经过NAC预处理的细胞中SH-CaO_2 NPs含量明显下降,且CCK-8实验结果提示,NAC预处理后细胞死亡率也随之降低。ROS的产生被普遍认为是NLRP3炎症小体激活的上游机制[23],本研究通过Western blot结果进一步验证,NAC预处理可抑制NLRP3/Caspase-1/GSDMD依赖的细胞焦亡的激活。表明SH-CaO_2 NPs可促进胃癌细胞内产生ROS并使其过多聚集,从而诱导胃癌细胞发生焦亡。为验证SH-CaO_2 NPs是否会对细胞焦亡通路中的各项蛋白(NLRP3、Caspase-1、GSDMD)产生影响,本研究运用抑制剂分别抑制NLRP3及Caspase-1,通过免疫荧光实验发现,SH-CaO_2 NPs能显著增加胃癌细胞内NLRP3以及Caspase-1蛋白的含量,而此过程可被相应抑制剂逆转。进一步运用Western blot实验验证可得到相同结果,CCK-8实验也证明使用抑制剂进行预处理能有效减少SH-CaO_2 NPs诱导的细胞死亡。进一步表明SH-CaO_2 NPs影响胃癌进展的机制是通过诱导胃癌细胞激活焦亡经典通路,即ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD,引起胃癌细胞焦亡。

综上所述,SH-CaO_2 NPs可以刺激ROS生成,激活NLRP3炎症小体,最终导致胃癌细胞焦亡。因此,靶向ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD依赖性焦亡可能是一种影响胃癌细胞发生发展的有效途径。这将有利于SH-CaO_2 NPs诱导的胃癌细胞焦亡进展进行安全性评估,并为纳米粒子的生物安全性研究提供一定理论基础。

参考文献:

[1] AJANI J A, D'AMICO T A, BENTREM D J, *et al*. Gastric cancer, Version 2. 2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(2): 167-192. DOI:10.6004/jnccn.2022.0008.

[2] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, *et al*. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012. DOI: 10.3390/ijms21114012.

[3] MONACK D M, RAUPACH B, HROMOCKYJ A E, *et al*. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9833-9838. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9833.

[4] SHI J J, ZHAO Y, WANG Y P, *et al*. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS[J]. Nature, 2014, 514(7521): 187-192. DOI: 10.1038/nature13683.

[5] SWANSON K V, DENG M, TING J P Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489. DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0.

[6] BURDETTE B E, ESPARZA A N, ZHU H, *et al*. Gasdermin D in pyroptosis[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2768-2782. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.006.

[7] YANG Y, LIU P Y, BAO W, *et al*. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 28. DOI: 10.1186/s12885-019-6491-6.

[8] 龚乾, 颉红杰, 双卫兵. 细胞焦亡在肿瘤中的研究进展[J]. 中国医学工程, 2022, 30(8): 54-57. DOI: 10.19338/j.issn.1672-2019.2022.08.011.
GONG Q, XIE H J, SHUANG W B. Research progress in effect of cell pyrosis on tumor progression[J]. China Med Eng, 2022, 30(8): 54-57. DOI: 10.19338/j.issn.1672-2019.2022.08.011.

[9] 付宇蕾, 罗业浩, 方刚, 等. 细胞焦亡在胃癌中的生物学作用研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2022, 49(6): 314-318. DOI: 10.12354/j.issn.1000-8179.2022.20210784.
FU Y L, LUO Y H, FANG G, *et al*. Research progress on biological role of pyrolysis in gastric cancer[J]. Chin J Clin Oncol, 2022, 49(6): 314-318. DOI: 10.12354/j.issn.1000-8179.2022.20210784.

[10] NAGARAJU G P, SRIVANI G, DARIYA B, *et al*. Nanoparticles guided drug delivery and imaging in gastric cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 69: 69-76. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.01.006.

[11] HU Y P, WANG X C, ZHAO P, *et al*. Nanozyme-catalyzed oxygen release from calcium peroxide nanoparticles for accelerated hypoxia relief and image-guided super-efficient photodynamic therapy[J]. Biomater Sci, 2020, 8(10): 2931-2938. DOI: 10.1039/D0BM00187B.

[12] 唐倩云, 杜凌, 刘培峰. 纳米粒子介导的胃癌诊断与治疗[J]. 肿瘤, 2022, 42(7): 518-524. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2022.2108-0552.
TANG Q Y, DU L, LIU P F. Nanoparticle-mediated diagnosis and treatment of gastric cancer[J]. Tumor, 2022, 42(7): 518-524. DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2022.2108-0552.

[13] ZHANG M, SONG R X, LIU Y Y, *et al*. Calcium-overload-mediated tumor therapy by calcium peroxide nanoparticles[J]. Chem, 2019, 5(8): 2171-2182. DOI: 10.1016/j.chempr.2019.06.003.

[14] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al*. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31288-5.

[15] JOSHI S S, BADGWELL B D. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. CA A Cancer J Clin, 2021, 71(3): 264-279. DOI: 10.3322/caac.21657.

[16] YANG F, LI A M, LIU H, *et al*. Gastric cancer combination therapy: synthesis of a hyaluronic acid and cisplatin containing lipid prodrug coloaded with sorafenib in a nanoparticulate system to exhibit enhanced anticancer efficacy and reduced toxicity[J]. Drug Des Dev Ther, 2018, 12: 3321-3333. DOI: 10.2147/dDDT.s176879.

[17] DING B B, CHEN H, TAN J, *et al*. ZIF-8 nanoparticles evoke pyroptosis for high-efficiency cancer immunotherapy[J]. Angew Chem Int Ed, 2023, 62(10): e202215307. DOI: 10.1002/anie.202215307.

[18] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109. DOI: 10.1038/nrmicro2070.

[19] LIU L H, ZHANG Y H, QIU W X, *et al*. Dual-stage light amplified photodynamic therapy against hypoxic tumor based on an O_2 self-sufficient nanoplatform[J]. Small, 2017, 13(37): 1-9. DOI: 10.1002/smll.201701621.

[20] MARTÍN MATEO M C, MARTÍN B, SANTOS BENEIT M, *et al*. Catalase activity in erythrocytes from colon and gastric cancer patients. Influence of nickel, lead, mercury, and cadmium[J]. Biol Trace Elem Res, 1997, 57(1): 79-90. DOI: 10.1007/BF02803872.

[21] WANG F H, LIANG Q Q, MA Y X, *et al*. Silica nanoparticles induce pyroptosis and cardiac hypertrophy via ROS/NLRP3/Caspase-1 pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 182: 171-181. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.027.

[22] XU K, CHANG M Q, WANG Z Y, *et al*. Multienzyme-mimicking $LaCoO_3$ nanotrigger for programming cancer-cell pyroptosis[J]. Adv Mater, 2023, 35(35): e2302961. DOI: 10.1002/adma.202302961.

[23] PERILLO B, DI DONATO M, PEZONE A, *et al*. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon[J]. Exp Mol Med, 2020,52(2): 192-203. DOI: 10.1038/s12276-020-0384-2.

(收稿:2023-10-17;修回:2023-12-26)

(编辑 汪勤俭)