

分类号： R751

单位代码： 10159

密 级： 公开

学 号： 2020110117



中国医科大学

博 士 学 位 论 文

中文题目： UVA 通过激活线粒体通路诱导成纤维细胞发生细胞焦亡及芍药苷通过该机制发挥保护作用的研究

英文题目： UVA induce pyroptosis in fibroblasts by activating mitochondrial pathway and the protective role of paeoniflorin through this mechanism

论文作者： 石东昕

指导教师： 吴 严 教授

学科专业： 皮肤与性病学

完成时间： 2023 年 2 月

中国医科大学博士学位论文

UVA 通过激活线粒体通路诱导成纤维细胞发生细胞焦亡及芍药苷通过该机制发挥保护作用的研究

UVA induce pyroptosis in fibroblasts by activating mitochondrial pathway and the protective role of paeoniflorin through this mechanism

论文作者 石东昕 指导教师 吴严 教授

申请学位 医学博士 培养单位 第一临床学院

一级学科 临床医学 二级学科 皮肤与性病学

研究方向 皮肤光损伤

论文起止时间 2020 年 9 月—2023 年 2 月

论文完成时间 2023 年 2 月

中国医科大学（辽宁）

2023 年 2 月

摘要

背景：大气中的紫外线会造成各种各样的皮肤问题，未做防护长时间暴露在烈日下可造成皮肤的急性光损伤，表现为红斑、水疱、疼痛。长波紫外线 UVA 穿透能力较强，可造成真皮层细胞的损伤，成纤维细胞作为真皮层的细胞组分，可分泌细胞外基质、合成胶原纤维和弹性纤维，而 UVA 可造成成纤维细胞的损伤导致真皮层基质组分失衡，进而产生皮肤光老化的表现。细胞焦亡是近几年发现的细胞一种新的调节性死亡方式，它由 gasdermin 蛋白家族所介导，gasdermin 蛋白被剪切后，其 N 端在细胞膜聚集成孔，引起细胞内渗透压变化进而引起细胞肿胀死亡，这一过程被称为细胞焦亡。Gasdermin E (GSDME) 作为 gasdermin 蛋白家族的一员也被发现参与细胞焦亡，GSDME 可以被 caspase-3 剪切并形成 gasdermin E-N 端参与细胞焦亡。氧化应激是 UVA 诱导成纤维细胞损伤的主要因素，线粒体发生氧化损伤后激活线粒体途径凋亡，形成 Cyto c/Apaf-1/Caspase-9 凋亡复合物，进而级联激活凋亡效应分子 caspase-3，因此 caspase-3 作为 gasdermin E 的上游分子和凋亡的效应分子，它将细胞凋亡与细胞焦亡相联系起来。目前已发现 UVA 可引起成纤维细胞发生细胞凋亡和自噬，是否会引引起成纤维细胞焦亡及其焦亡通路还未可知。芍药苷是中药白芍总苷中的主要活性成分，是单萜苷类化合物，它作为抗氧化剂可以通过激活 Nrf2/HO-1 通路减轻 UVA 引起的成纤维细胞氧化损伤。但芍药苷是否会通过减轻氧化应激进而抑制细胞焦亡的研究还很少。本研究先探究了 UVA 是否会诱导成纤维细胞焦亡及其焦亡通路，然后探索氧化应激是否参与其中，随后进一步对芍药苷能否在其中发挥保护作用进行了探究。

目的：本研究旨在探究细胞焦亡参与皮肤成纤维细胞光损伤的分子机制及探索芍药苷在皮肤光损伤保护方面的理论依据，为皮肤光损伤的防护提供新方向。

研究方法: 1、明确 UVA 通过氧化应激引起成纤维细胞发生焦亡。以永生化人皮肤成纤维细胞和人包皮组织提取的真皮成纤维细胞作为研究对象。应用不同剂量的 UVA (0、10、20、30J/cm²) 照射细胞建立光损伤模型, 照射后于光镜下观察细胞形态, MTS 法检测细胞活力, 乳酸脱氢酶释放及 YO-PRO-1/PI 荧光染色检测细胞损伤情况, 从而选择合适的诱导焦亡剂量。给予细胞不同浓度的抗氧化剂 NAC (0、1.25、2.5、5、10mM) 处理, MTS 法检测细胞活力, 从而评估 NAC 药物毒性, 选择合适处理浓度。在细胞照光后给予 NAC 处理, 光镜下观察细胞形态, MTS 法检测细胞活力, 乳酸脱氢酶释放及 YO-PRO-1/PI 荧光染色检测细胞损伤情况。2、明确 UVA 诱导成纤维细胞焦亡的机制和氧化应激的影响。细胞给予合适剂量的 UVA 处理后, 分别以 RT-qPCR 于转录水平、Western blot 于蛋白水平检测参与细胞焦亡的部分分子, 包括 NLRP3、caspase-1、caspase-3、caspase-4、GSDMD、GSDME, 同时使用质粒敲低处理, 对激活的焦亡通路进行验证。在细胞照光后给予 NAC 处理, Western blot 于蛋白水平检测 PARP、caspase-3、GSDME 的变化。确定线粒体途径凋亡和氧化应激的参与。细胞给予 UVA 照光处理后, JC-1 检测线粒体膜电位变化, Western blot 于蛋白水平检测线粒体途径凋亡通路相关分子 Bax、Cyto c、caspase-9, 并在照光后不同时间提取蛋白, 对线粒体途径凋亡分子和细胞焦亡分子分别进行检测, 观察两者激活时间有无先后顺序。在细胞照光后给予 NAC 处理, JC-1 检测线粒体膜电位变化, Western blot 检测线粒体途径凋亡通路相关分子 Bax、Bcl-2、Cyto c、caspase-9 变化。3、明确芍药苷对细胞焦亡的抑制作用。给予细胞不同浓度的芍药苷 (0、100、200、400、800 μ M) 处理后, MTS 法检测细胞活力, 从而评估芍药苷药物毒性, 筛选出芍药苷最适药物浓度。药物处理组给予细胞芍药苷预培养 3 小时后, 进行 UVA 照射, 照射后加芍药苷继续对细胞进行培养, 光镜下观察细胞形态, MTS 法检测细胞活力, 乳酸脱氢酶释放及 YO-PRO-1/PI 荧光染色检测细胞损伤程度, JC-1 检测线粒体膜电位变化, Western blot 检测线粒体途径凋亡通路相关分子 Bax、Bcl-2、Cyto c、caspase-9 和细胞焦亡分子 caspase-3、GSDME。

结果: 1、UVA 照射引起皮肤成纤维细胞发生细胞焦亡且呈剂量依赖性, 选择 $30\text{J}/\text{cm}^2$ 的 UVA 剂量用于后续实验。在成纤维细胞照光后用 5mM NAC 处理抑制氧化应激, 与未加 NAC 处理的细胞相比, 发生焦亡的细胞比例明显降低。2、UVA 剂量为 $30\text{J}/\text{cm}^2$ 时, 可激活细胞 caspase-3/GSDME 的细胞焦亡通路, 未激活 NLRP3 炎症小体 Caspase-1/GSDMD 的经典焦亡通路。对 caspase-3 进行敲低后, 发现其照光刺激后在蛋白水平上 GSDME 剪切减少。同时, 照光后加 NAC 的细胞与未加药细胞相比, 其 caspase-3/GSDME 焦亡通路的激活受到了抑制。UVA 照射后呈剂量依赖性地使细胞线粒体膜电位下降, 同时线粒体途径凋亡相关分子 Bax、Cyto c 升高, 剪切激活 caspase-9, 且线粒体途径凋亡的激活早于细胞焦亡的发生。与未经处理的细胞相比, 经过抗氧化剂 NAC 处理的细胞在照光后线粒体膜电位升高, Bax、Cyto c 及 cleaved caspase-9 表达下降。3、经细胞毒性检测, 选择 $400\mu\text{M}$ 的芍药苷浓度用于后续实验。与未经处理的细胞相比, 经过芍药苷处理的细胞在照光后, 其线粒体膜电位升高, Bax、Cyto c 及 cleaved caspase-9 表达下降, caspase-3/GSDME 焦亡通路受到抑制, 发生焦亡的细胞比例降低。

结论: 1、UVA 通过氧化应激诱导皮肤成纤维细胞发生细胞焦亡。2、UVA 引起线粒体途径凋亡激活, 进而激活 GSDME 诱导焦亡发生。3、芍药苷通过抑制氧化应激抑制 UVA 诱导的线粒体途径凋亡和细胞焦亡。

关键词: UVA; 细胞焦亡; 氧化应激; 线粒体途径凋亡; 芍药苷

Abstract

Background: Ultraviolet light in the atmosphere can cause a variety of skin problems. Prolonged exposure to the hot sun without protection can cause acute photodamage to the skin, characterized by erythema, blisters, and pain. The penetrating ability of UVA is strong, which can cause the damage of dermis cells. Fibroblasts, the cellular component of the dermis, secrete extracellular matrix and synthesize collagen and elastic fibers, and UVA can cause damage to fibroblasts resulting in imbalance of dermal matrix components, which in turn produces the manifestation of skin photoaging. Pyroptosis is a new regulatory cell death discovered in recent years, which is mediated by the gasdermin family of proteins. After the gasdermin proteins are cleaved, their N-terminal accumulate on the cell membrane and form pores, causing changes in intracellular osmotic pressure, which leads to cell swelling and death. This process is called pyroptosis. GSDME, as a member of the gasdermin protein family, has also been found to be involved in cell pyroptosis. GSDME can be cleaved by caspase-3 and form gasdermin E-N terminal which induces cell pyroptosis. Oxidative stress is the main factor of UVA-induced fibroblast damage. After oxidative damage of mitochondria, it activates apoptosis of the mitochondrial pathway, forming the Cyto c/Apaf-1/Caspase-9 apoptosis complex, and then cascading activates the apoptosis effector caspase-3, so caspase-3 as the upstream molecule of gasdermin E and the effector molecule of apoptosis, which links apoptosis with the pyroptosis. At present, it has been found that UVA can cause apoptosis and autophagy in fibroblasts, and whether it can cause pyroptosis and the involved pathway is unknown. Paeoniflorin is the main active ingredient of the Chinese medicine total glucosides of paeony, which is a monoterpenoid glycoside compound. As an antioxidant, paeoniflorin can reduce the oxidative damage of fibroblasts caused by UVA through activating Nrf2/HO-1 pathway. However, there is little research on paeoniflorin inhibits pyroptosis by reducing oxidative stress. In this study, we first explored whether UVA induces pyroptosis of fibroblasts and its pathway, then explored whether oxidative stress is involved, and then further explored whether paeoniflorin can play a protective role.

Objective: The aim of this study was to find out the molecular mechanism of cell pyroptosis in skin fibroblast photodamage and explore the theoretical basis of paeoniflorin

in skin photodamage protection, providing a new direction for skin photodamage protection and treatment.

Methods: 1. Define UVA causes pyroptosis of fibroblasts through oxidative stress. Immortalized human skin fibroblasts and dermal fibroblasts extracted from human foreskin tissue were used as research objects. Different doses of UVA (0, 10, 20, 30J/cm²) were irradiated into cells to establish a photodamage model. After irradiation, cell morphology was observed under the light microscope. Cell vitality, lactate dehydrogenase release and YO-PRO-1/PI fluorescence staining were used to detect cell damage, so as to select the appropriate dose to induce pyroptosis. The cells were treated with different concentrations of antioxidant NAC (0, 1.25, 2.5, 5, 10mM), and cell viability was detected to evaluate the drug toxicity of NAC and select the appropriate treatment concentration. Fibroblasts were treated with NAC after the UVA irradiation. After irradiation, cell morphology was observed under the light microscope. Cell vitality, lactate dehydrogenase release and YO-PRO-1/PI fluorescence staining were used to detect cell damage. 2. Clarify the UVA-induced pyroptosis pathway and the effect of oxidative stress. After the cells were treated with appropriate dose of UVA, RT-qPCR and Western blot were used to detect partial molecules involved in pyroptosis at transcription level and protein level respectively, including NLRP3, caspase-1, caspase-3, caspase-4, GSDMD and GSDME. And then knocking down the exact molecule with plasmids was used to validate the activated pyroptosis pathway. Fibroblasts were treated with NAC after the UVA irradiation, and then PARP, caspase-3, GSDME were detected by Western blot to make sure the role of oxidative stress at the pyroptosis pathway. Determine the involvement of mitochondrial-mediated apoptosis pathway and oxidative stress. After the cells were treated with UVA irradiation, the changes of mitochondrial membrane potential were detected by JC-1, and molecules involved in mitochondrial-mediated apoptosis pathway were detected by Western blot, including Bax, Cyto c and caspase-9. The proteins of cells were extracted at different times after irradiation and then detected mitochondrial-mediated apoptosis pathway molecules and pyroptosis molecules respectively, to observe the order of their activation. To explore the effect of oxidative stress, fibroblasts were treated with NAC after the UVA irradiation. After irradiation, the changes of mitochondrial membrane potential were detected by JC-1. Bax, Bcl-2, Cyto c and caspase-9 were detected by Western blot. 3. Clarify the inhibitory

effect of paeoniflorin to pyroptosis. Cells were treated with different concentrations of paeoniflorin (0, 100, 200, 400, 800 μ M), and cell viability was detected to evaluate the toxicity of paeoniflorin and select the optimal concentration of paeoniflorin. For the drug treatment group, cells were treated with paeoniflorin for 3 hours, and then UVA irradiation was performed. After irradiation, paeoniflorin was added again and continue cell culture. Cell morphology was observed under the light microscope. Cell vitality, lactate dehydrogenase release and YO-PRO-1/PI fluorescence staining were used to detect cell damage. The changes of mitochondrial membrane potential were detected by JC-1. Bax, Bcl-2, Cyto c, caspase-9 and caspase-3, GSDME were detected by Western blot.

Results: 1. UVA irradiation caused pyroptosis of skin fibroblasts in a dose-dependent manner. UVA dose of 30J/cm² was selected for subsequent experiments. When the fibroblast cells were treated with 5mM NAC to inhibit oxidative stress after light exposure, the proportion of pyroptosis was significantly reduced compared with those without NAC treated. 2. When UVA dose was 30J/cm², the caspase-3/GSDME-dependent pyroptosis pathway was activated, but the NLRP3 inflammasome pathway of caspase-1/GSDMD was not activated. At the protein level, cleaved GSDME was found to be reduced in the knockdown of caspase-3 after the UVA irradiation. The activation of the caspase-3/GSDME pyroptosis pathway was inhibited in the NAC treated group. After UVA irradiation, the mitochondrial membrane potential decreased in a dose-dependent manner, while Bax and Cyto c, the related molecules of mitochondrial-mediated apoptosis pathway increased, and caspase-9 was activated through being cleaved. Moreover, the activation of mitochondrial-mediated apoptosis pathway was earlier than the occurrence of pyroptosis. Compared with untreated cells, the antioxidant NAC treated group showed that mitochondrial membrane potential increased, Bax, Cyto c and cleaved caspase-9 expression decreased after UVA irradiation. 3. After the cytotoxic test, 400 μ M concentration of paeoniflorin was selected for subsequent experiments. Compared with untreated cells, the paeoniflorin treated group showed that mitochondrial membrane potential increased, Bax, Cyto c and cleaved caspase-9 expression decreased, caspase-3/GSDME pathway was inhibited, and the proportion of pyroptosis decreased after UVA irradiation.

Conclusion: 1. UVA induces pyroptosis in skin fibroblasts through oxidative stress. 2. UVA

induces mitochondrial-mediated apoptosis pathway activation, which activates the GSDME dependent pyroptosis pathway. 3. Paeoniflorin can inhibit UVA-induced mitochondrial-mediated apoptosis pathway and pyroptosis by inhibiting oxidative stress.

Key words: UVA; Pyroptosis; Oxidative stress; Mitochondrial-mediated apoptosis pathway; Paeoniflorin

英文缩略语

| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
|---------|--|--|
| Apaf-1 | Apoptotic protease activating factor-1 | 凋亡酶激活因子 1 |
| APS | Ammonium persulfate | 过硫酸铵 |
| ASC | Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain | 凋亡相关斑点样蛋白 |
| Bax | BCL2-Associated X | Bcl-2 相关 X 蛋白 |
| BCA | Bicinchoninic acid | 二辛可宁酸 |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma-2 | 2 型 B 淋巴细胞 |
| Caspase | CysteinyI aspartate specific proteinase | 天冬半胱氨酸特异性蛋白酶 |
| Cyto c | Cytochrome c | 细胞色素 c |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle medium | 达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 |
| ECL | Enhanced chemiluminescence | 增强型化学发光剂 |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 |
| HaCaT | Human immortalized keratinocytes | 人永生角质形成细胞 |
| HDF | Human dermal fibroblast | 原代人真皮成纤维细胞 |
| HO-1 | Heme oxygenase-1 | 血红素加氧酶 1 |
| HSF | Human skin fibroblast | 永生人皮肤成纤维细胞 |
| IL | Interleukin | 白细胞介素 |
| LDH | Lactate dehydrogenase | 乳酸脱氢酶 |
| MMPs | Matrix metalloproteinases | 基质金属蛋白酶 |
| MTS | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium | 3- (4, 5-二甲基吡啶-2-基) -5- (3-羧基甲氧基苯基) -2- (4-磺苯基) -2H-四唑 |
| NAC | N-acetyl-L-cysteine | N-乙酰-L-半胱氨酸 |

| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
|----------|--|---------------------------------------|
| NLRP3 | Nucleotide oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing 3 | 含核苷酸结合寡聚结构域, 富含亮氨酸重复序列和 Pyrin 结构域蛋白 3 |
| NLRs | Nucleotide oligomerization domain-like receptors | 核苷酸寡聚化结构域样受体 |
| NQ-O1 | NADH Quinone Oxidoreductase 1 | 醌氧化还原酶 1 |
| Nrf2 | Nuclear factor erythroid2-related factor 2 | 核因子 E2 相关因子 2 |
| PARP | Poly ADP-ribose polymerase | 聚 ADP 核糖聚合酶 |
| PBS | Phosphate buffered solution | 磷酸盐缓冲溶液 |
| PF | Paeoniflorin | 芍药苷 |
| PI | Propidium Iodide | 碘化丙啶 |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride | 苯甲基磺酰氟 |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride | 聚偏二氟乙烯 |
| RIPA | Radio Immunoprecipitation Assay | 放射免疫沉淀法 |
| ROS | Reactive oxygen species | 活性氧簇 |
| RT-qPCR | Real Time Quantitative PCR | 实时定量 PCR |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis | 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| SOD | Superoxide Dismutase | 超氧化物歧化酶 |
| TBST | Tris Buffered Saline with Tween 20 | Tris 盐缓冲液含吐温 20 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine | 四甲基聚乙二醇 |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol | 2-氨基-2-羟甲基-1,3-丙二醇 |
| UVA | Ultraviolet A | 长波紫外线 |

目 录

| | |
|---|----|
| 第一部分:UVA 通过氧化应激诱导人皮肤成纤维细胞发生细胞焦亡..1 | |
| 1 前言..... | 1 |
| 2 材料和方法..... | 3 |
| 2.1 材料..... | 3 |
| 2.2 方法..... | 4 |
| 2.3 统计学分析..... | 11 |
| 3 结果..... | 12 |
| 3.1 UVA 引起真皮成纤维细胞发生细胞焦亡的形态学改变..... | 12 |
| 3.2 不同剂量 UVA 导致成纤维细胞活力改变..... | 12 |
| 3.3 不同剂量 UVA 导致成纤维细胞 LDH 释放改变..... | 13 |
| 3.4 不同剂量 UVA 对成纤维细胞损伤程度的影响..... | 14 |
| 3.5 氧化应激参与 UVA 诱导成纤维细胞焦亡..... | 16 |
| 4 讨论..... | 19 |
| 5 结论..... | 21 |
| 第二部分:UVA 通过线粒体途径激活 CASP3/GSDME 通路诱导成纤维细胞焦亡..... | 22 |
| 1 前言..... | 22 |
| 2 材料和方法..... | 24 |
| 2.1 材料..... | 24 |
| 2.2 方法..... | 26 |
| 2.3 统计学分析..... | 34 |
| 3 结果..... | 35 |
| 3.1 UVA 照射成纤维细胞后焦亡通路转录水平的改变..... | 35 |
| 3.2 UVA 照射成纤维细胞后焦亡通路蛋白水平的改变..... | 36 |
| 3.3 不同剂量 UVA 对成纤维细胞 caspase-3 和 GSDME 激活的影响..... | 36 |
| 3.4 UVA 激活成纤维细胞 caspase-3/GSDME 通路的验证..... | 37 |
| 3.5 氧化应激参与 UVA 诱导成纤维细胞 caspase-3/GSDME 细胞焦亡通路的激活..... | 39 |
| 3.6 UVA 激活皮肤成纤维细胞线粒体途径凋亡..... | 39 |
| 3.7 氧化应激参与 UVA 诱导的线粒体途径凋亡..... | 41 |
| 4 讨论..... | 43 |
| 5 结论..... | 46 |
| 第三部分:芍药苷通过减轻氧化应激抑制 UVA 诱导的线粒体途径凋亡 | |

| | |
|--|----|
| 及细胞焦亡 | 47 |
| 1 前言 | 47 |
| 2 材料和方法 | 49 |
| 2.1 材料 | 49 |
| 2.2 方法 | 51 |
| 2.3 统计学分析 | 54 |
| 3 结果 | 55 |
| 3.1 不同浓度芍药苷对细胞毒性影响 | 55 |
| 3.2 芍药苷减轻 UVA 诱导的线粒体途径凋亡 | 55 |
| 3.3 芍药苷抑制 UVA 诱导成纤维细胞发生细胞焦亡 | 57 |
| 3.4 芍药苷抑制 caspase-3/GSDME 焦亡通路激活 | 59 |
| 4 讨论 | 61 |
| 5 结论 | 63 |
| 本研究创新性的自我评价 | 64 |
| 参考文献 | 65 |
| 综述 GSDME 介导的细胞焦亡及其在肿瘤方面的研究进展 | 73 |
| 参考文献 | 80 |

第一部分：UVA 通过氧化应激诱导人皮肤成纤维细胞发生细胞焦亡

1 前言

目前全球环境污染情况加重，臭氧层出现逐年变薄趋势，到达地球的紫外线辐射量逐年增加，因此大众对于光老化的关注越来越多，为了达到更有效预防和治疗光老化的目的，研究皮肤光老化的相关机制也成为医学热点问题。皮肤的光老化是在皮肤的暴露部位由于接触到紫外线辐射，产生了皮肤衰老的表现，包括皮肤粗糙、皱纹和色素增多、弹性降低、出现血管和红斑问题。紫外线根据波长被分为 UVA (320-400 nm)、UVB (280-320 nm)及 UVC (200-280 nm)。阳光能照射到地球上的紫外线是 UVA 和 UVB，分别占总量的 95%和 5%。由于 UVA 是太阳紫外线辐射中最主要的成分，UVA 引起的皮肤问题成为研究热点。UVA 较 UVB 辐射穿透能力更强，它可以穿透表皮深入渗透到真皮层，通过刺激真皮层的成纤维细胞，引起真皮结缔组织的改变^[1,2]。已有研究发现，UVA 辐射会导致真皮结构恶化和光老化的临床表现，包括色素沉着、皱纹、松弛、皮肤干燥等^[3]。成纤维细胞作为真皮层的主要细胞组分，它可以通过分泌胶原蛋白、弹性纤维和透明质酸这些细胞外基质组分，实现其维持皮肤真皮结构的功能。UVA 造成成纤维细胞的损伤会导致其刺激胶原蛋白降解和减少胶原蛋白的产生，从而真皮支撑结构改变，表现为出现皮肤皱纹、松弛等。

UVA 对于皮肤细胞的损伤主要是通过氧化应激，其产生过量的活性氧 (ROS)^[4]。ROS 是一种较为活跃的分子，诱导细胞必需大分子(包括脂类、蛋白质和核酸)损伤，参与细胞损伤和分子信号转导^[5]。在 UVA 辐射皮肤后，细胞内的 ROS 激活 NF- κ B 通路，诱导炎症因子的表达^[6]。同时，UVA 还可以诱导成纤维细胞内 MAPK 通路激活，此通路可使 AP-1 表达增加，该转录激活因子增加了基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达，使胶原蛋白表达减少^[7]，TGF- β 受体表达降低，这些最终导致了真皮层的细胞外基质组分紊乱^[3]。

细胞程序性死亡对于生物的生长，存活，稳态和先天性至关重要。细胞焦亡是一种新的细胞死亡形式，最早在 1992 年被报道^[8]，其被定义为是 gasdermin 家族依赖性的细胞程序性死亡^[9]。细胞焦亡的发生是由于细胞内外刺激激活半胱氨酸

天冬酶 (caspases), 焦亡的效应分子 gasdermin 蛋白家族被激活的 caspase 剪切并形成 N 端结构域, N 端结构域在膜上聚集成孔, 引起细胞内渗透压变化, 出现细胞肿胀的表现, 最终导致细胞破裂死亡^[10,11]。细胞焦亡和细胞凋亡同属于细胞程序性死亡, 在形态学表现上, 细胞焦亡具有细胞凋亡的部分特征, 包括凋亡指标 Annexin V 染色阳性、DNA 断裂、染色质浓缩等, 但有所不同的是, 细胞焦亡最终出现细胞肿胀、膜破裂的表现, 而细胞凋亡细胞膜相对完整, 可基于此对细胞凋亡和细胞焦亡予以区分。

低剂量的 UVA 虽不会直接降低细胞活性, 但可引起细胞内代谢紊乱, 产生 ROS 和 DNA 损伤^[12], 长期作用下引起皮肤光老化。高剂量的 UVA 可通过激活细胞死亡通路, 直接降低细胞活力, 加重皮肤炎症和皮肤老化^[13,14]。有研究对体外重建皮肤模型施以 UVA 照射, 发现真皮层成纤维细胞在 48 小时后消失, 而表皮结构和组织没有显著影响, 表明暴露于单独的 UVA 下, 真皮成纤维细胞的存活能力低于表皮角质形成细胞^[15]。目前研究已发现 UVA 辐射可引起真皮成纤维细胞出现不同形式的死亡, 包括细胞凋亡^[16,17]、细胞自噬^[18]。但关于高剂量 UVA 是否会引起真皮成纤维细胞发生细胞焦亡还未有研究, 因此, 我们基于目前研究现状用中高剂量的 UVA 照射真皮成纤维细胞, 分别从细胞形态学变化、细胞活力、细胞膜损伤情况和代表性小分子荧光染料进行检测, 从而明确 UVA 是否会造成真皮成纤维细胞焦亡。另外, 我们课题组前期已经明确 UVA 可引起真皮成纤维细胞内产生过量的 ROS^[19], 下一步我们想要探究 ROS 在细胞焦亡激活中的作用, 在照光后使用抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC, N-acetyl-L-cysteine) 对细胞进行抗氧化干预后, 对细胞焦亡的指标进行检测, 为后续进一步探索参与其中的通路奠定基础。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验对象

(1) 永生化人皮肤成纤维细胞 (HSF), 购于赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。

(2) 人真皮成纤维细胞 (HDF), 提取于人包皮组织, 来自于中国医科大学附属第一医院泌尿外科手术室。

2.1.2 主要试剂

PBS 缓冲液 (中国, Biosharp 生物公司)

青霉素/链霉素抗生素溶液 (以色列, Biological Industries 公司)

DispaseII (美国, Sigma 公司)

一型胶原酶 (美国, Sigma 公司)

DMEM 高糖培养基 (中国, 道鹏生物科技公司)

胰蛋白酶 (以色列, Biological Industries 公司)

胎牛血清 (中国, 道鹏生物科技公司)

无血清细胞冻存液 (中国, 新赛美生物科技公司)

MTS 细胞增殖检测试剂盒 (美国, Promega 公司)

乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)

YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)

NAC 抗氧化剂 (中国, 碧云天生物技术公司)

2.1.3 主要仪器

-80°C 深低温冰箱 (美国, Thermo 公司)

-20°C 低温冰箱 (德国, 西门子公司)

4°C 冰箱 (美国, Thermo 公司)

微量移液器 (美国, Rainin 公司)

恒温水浴箱 (美国, Thermo 公司)

恒温二氧化碳细胞培养箱 (美国, Thermo 公司)

生物安全操作台 (美国, Thermo 公司)

光学显微镜（日本，Olympus 公司）
Sorvall ST 40R 台式冷冻离心机（美国，Thermo 公司）
UV 801KL（德国，Waldmann 公司）
涡旋振荡器（中国，其林贝尔仪器公司）
台式离心机（美国，Thermo 公司）
酶标仪（美国，BioTek 公司）
水平摇床（中国，其林贝尔仪器公司）
共聚焦显微镜（日本，Olympus 公司）
荧光显微镜（美国，BioTek 公司）

2.2 方法

2.2.1 原代人真皮成纤维细胞提取

（1）清洗包皮组织：用含 5%体积双抗溶液的 PBS 混合液反复冲洗新鲜包皮组织，直至其表面红色褪去。用镊子小心夹取包皮组织，在 75%的酒精中清洗 30 秒，接着在含 5%体积双抗溶液的 PBS 混合液中清洗 2 次，每次清洗 10 分钟，同时在清洗过程中去除包皮组织中的皮下组织，清洗 2 次后，再在 75%的酒精中清洗 30 秒。

（2）Dispase II 浸泡：用组织剪小心将组织均匀剪成长、宽约 1cm 的小组织块，移至 50ml 离心管中，并在离心管中加入 2.5mg/ml 的 Dispase II 溶液，置于 4℃ 过夜。

（3）分离真表皮：第二天，将离心管内混合物倒入培养皿中，用吸管小心吸出 Dispase II，之后为防止组织干燥加入少量 PBS 溶液，用镊子小心分离真表皮。

（4）组织解离：成功分离后，剪碎真皮组织，并移至离心管内，在离心管中加入 10ml 0.25mg/ml 一型胶原酶，37℃ 水浴锅内震荡消化 1-1.5 小时，直至组织块出现絮状物。震荡结束后，加入等体积的细胞培养基以终止消化，进行离心 1200rpm，5 分钟，离心结束后倒掉上清。

（5）消化组织：向离心管内添加 10ml-15ml 胰蛋白酶，用吸管匀速吹打 30-40 次，吹打结束后放于 37℃ 水浴锅内消化 15 分钟。

（6）消化结束：用吸管匀速吹打 30-40 次，加入等体积的细胞培养基终止消化。将混合物用 200 目滤网进行过滤，过滤后的混合液收集在 50ml 离心管内。（为提高细胞产量，可以在过滤前加入一型 DNA 酶，室温 5 分钟）

（7）细胞培养：离心 1200rpm，5 分钟，离心结束后倒掉上清，加入适量细胞

培养基进行重悬，并将细胞悬液转移至培养瓶内，置于 37℃，5%CO₂ 培养箱孵育。

2.2.2 细胞换液

(1) 对操作台进行紫外消毒，消毒 30 分钟后关闭紫外灯，操作前双手需先用 75%酒精进行消毒。

(2) 从细胞培养箱中取出培养瓶，在光学显微镜下观察细胞生长密度和生长状态，对瓶外与有菌台面接触过的地方进行酒精消毒后放入工作台，并将 DMEM 细胞培养基、吸管、移液器、吸头等耗材消毒后放入工作台。

(3) 首先迅速倒出培养瓶内原有培养基，悬空倒入废液缸中，及时将培养瓶盖上。

(4) 插上已高压消毒过的新吸头，移液器从装有新培养基的离心管内吸出适当体积的培养基，加到培养瓶中左右晃动几下，使培养基覆盖细胞。

(5) 从操作台中拿出培养瓶，置于光学显微镜下观察细胞状态，观察后小心将培养瓶平放于培养箱中，继续培养。

(6) 培养细胞过程中，需及时观察细胞的生长情况。

2.2.3 细胞传代

(1) 对操作台进行紫外消毒，消毒 30 分钟后关闭紫外灯，操作前双手需先用 75%酒精进行消毒。

(2) 在光学显微镜下观察细胞密度，当细胞密度大于 90%时即可对细胞进行传代处理。

(3) 迅速倒出培养瓶内原有培养基，悬空倒入废液缸中，及时将培养瓶盖上。

(4) 更换新的吸头，用移液器向培养瓶中加入足以覆盖细胞体积的 PBS 缓冲液，洗涤 2 次，洗去细胞培养瓶中残留的细胞培养基后倒去 PBS 缓冲液。

(5) 更换新的吸头，用移液器向培养瓶中加入适当体积的胰酶，轻轻晃动培养瓶，使加入的胰酶能完全覆盖瓶内细胞，快速将培养瓶放入 37℃，5% CO₂ 细胞培养箱中，将细胞消化 3 分钟。

(6) 消化时间到后，迅速从培养箱中拿出细胞培养瓶，在光学显微镜下观察细胞的消化情况，若观察到细胞变圆变亮后并在轻轻晃动培养瓶时，随瓶内液体移动，则立即停止消化。在操作台上，用移液器向培养瓶中加入与胰酶等体积的 DMEM 细胞培养基终止消化。

(7) 更换新吸头，用移液器将培养瓶中的胰酶、培养基和消化好的细胞混合物

移入离心管中，1000rpm，离心 3 分钟。

(8) 从离心机中取出离心管，拿入操作台，直接将离心管中的上清液倒入废液缸中，则沉淀部分为细胞组分，用移液器加入适当体积的细胞培养基对细胞进行重悬。根据细胞传代密度准备适当个数的培养瓶，在新培养瓶中先加入新培养基对细胞培养面覆盖浸润，然后将细胞悬液均匀加入各培养瓶中，在培养瓶表面标注好传代日期、细胞类型和代数，对培养瓶进行十字摇晃，使细胞分布均匀后，放于 37℃，5% CO₂ 的培养箱中继续培养。

2.2.4 细胞冻存与复苏

(1) 细胞冻存

进行细胞冻存操作前，需观察细胞生长状态，当细胞处于对数生长期且生长状态良好时，方可进行冻存操作。从培养箱中拿出培养瓶，倒出培养瓶原有培养基，用移液器加入适量 PBS 缓冲液对瓶内残余的培养基进行清洗 2 次，消化步骤与细胞传代类似，对细胞进行胰酶消化 3 分钟后镜下观察细胞消化情况，消化完毕后用细胞培养基终止消化，并将瓶内混合物移入离心管，1000rpm，离心 3 分钟，倒去上清，向离心管中加入 1ml 无血清细胞冻存液对细胞进行重悬，用移液器轻轻吹打细胞悬液，转入细胞冻存管中，在冻存管上记录冻存时间和细胞名称及代数后，将冻存管置于梯度冻存盒中，放入-80℃冰箱内。

(2) 细胞复苏

从深低温冰箱中拿出之前冻存的细胞，迅速并小心用镊子将冻存管的下半部分浸入 37℃ 的水浴锅中，并快速不断地对冻存管进行摇晃直至其内冻存液融化。将融化的冻存管转移至操作台，迅速将冻存管内的细胞悬液转移到离心管中，小心先慢后快地加入适量完全培养基，1000rpm，离心 3 分钟，倒去上清液，用移液器加入完全培养基对细胞进行重悬，准备新培养瓶，加入新细胞培养基对瓶内细胞培养面进行覆盖浸润，之后加入细胞悬液，在培养瓶上标好复苏时间、细胞类型和代数，将培养瓶放于 37℃，5% CO₂ 的培养箱中继续培养。

2.2.5 细胞照光

(1) 细胞计数：在细胞处于对数生长期且密度为 80-90% 时进行细胞计数，用于后续细胞铺板。胰酶消化细胞，离心，去除上清液，用适量体积的完全培养基重悬，从中取出 30μl 细胞悬液，加入到 1.5ml EP 管中，再加入 90μl 完全培养基将其稀释 4 倍。酒精擦拭细胞计数板，盖上盖玻片，使用移液枪从 EP 管中吸取 10μl 细

胞悬液，从盖玻片边缘滴加到细胞计数板上，100倍显微镜下观察，计数4个象限内的细胞总数，共计数2-3次，取平均值，计算细胞浓度(个/ml) = $N/4 \times 10^4 \times 4$ 。

(2) 细胞铺板：根据后续的实验安排，选择合适的培养板或培养皿，根据培养底面积大小进行细胞数目的换算，保证每次实验的细胞密度基本一致。根据细胞计数的结果对细胞进行铺板，将铺板后的细胞培养板或培养皿放回培养箱中继续培养。

(3) 细胞照光：在显微镜下观察到铺板后的细胞密度达到80-90%时，将培养板或培养皿中的原有培养液吸出，加入预冷过的4℃的PBS缓冲液，PBS缓冲液体积根据培养底面积大小换算，每平方厘米100 μ l。将细胞培养板置于紫外线灯管下，调整灯管位置，使细胞与灯管的距离为15cm，进行UVA照射，对于不进行照光处理的对照组，将其表面用铝箔纸覆盖进行遮光处理。UVA照光处理后，将细胞培养孔中的PBS缓冲液倒掉，加入新的细胞培养基，将照光后的细胞放回培养箱中继续培养。

2.2.6 MTS 检测不同剂量 UVA 对细胞活力的影响

(1) 细胞计数。

(2) 细胞铺板：将计数后的成纤维细胞，接种于96孔板，细胞数量为5000个细胞每孔，每组设置3个副孔，每孔加入100 μ l DMEM培养基，于5% CO₂，37℃培养箱中继续培养。

(3) 细胞照光：在显微镜下观察到铺板后的细胞密度达到80-90%时，对细胞进行梯度UVA照射，剂量分别为0、10、20、30J/cm²，照射后将细胞放回培养箱中继续培养。

(4) 检测 MTS 细胞活力：于培养箱培养24小时后检测细胞的增殖活性。分别于每孔加入10 μ l MTS试剂，37℃培养箱中继续培养3小时后，酶标仪检测490nm处波长的吸光值。

(5) 数据统计：默认对照组细胞活力为100%，其他组的细胞活力为(各组490nm处吸光值/对照组490nm处吸光值) × 100%。

2.2.7 不同剂量 UVA 照光后检测细胞上清液乳酸脱氢酶释放百分比

(1) 细胞计数。

(2) 细胞铺板：将处于对数生长期的成纤维细胞，接种于96孔板，细胞数量为5000个细胞每孔，每组设置3个副孔，每孔DMEM培养液体积为100 μ l，于5% CO₂，37℃培养箱中培养。细胞分组为：背景空白对照组、未照光对照组、未照光最

大酶活性对照组、照光处理组（分为不同剂量）。

（3）细胞照光：待细胞密度达到 80-90% 时进行照光处理，对细胞进行梯度 UVA 照射，剂量分别为 0、10、20、30J/cm²，照光后各孔加入 200μl 无血清培养基，放回培养箱中继续培养。

（4）在到达预定检测时间点的前 1 小时从培养箱中取出细胞培养板，在“未照光处理最大酶活性对照组”中加入试剂盒的 LDH 释放试剂组分，加入体积为 10% 的原有培养液体积。加入 LDH 释放试剂后，在孔板内反复轻柔吹打数次进行混匀，然后继续在细胞培养箱中孵育。

（5）到达预定检测时间时，将培养板用多孔板离心机 400g 离心 5 分钟。分别取 120μl 各孔的上清液，加入到一新的 96 孔板相应孔中，在孵育后进行样品测定。

（6）样品测定：各孔分别加入 60μl LDH 检测工作液，混匀。室温用铝箔包裹后置于水平摇床缓慢摇动 30 分钟，然后用酶标仪在 490nm 处测定吸光度。

（7）计算：各孔吸光度减去背景空白对照孔吸光度，LDH 释放百分比（%）=（照光处理组吸光度-未照光对照孔吸光度）/（细胞最大酶活性的吸光度-未照光对照孔吸光度）×100。

2.2.8 不同剂量 UVA 照光后进行 YO-PRO-1/PI 荧光细胞双染实验

（1）细胞计数。

（2）细胞铺板：将处于对数生长期的成纤维细胞接种于 12 孔板中，每孔细胞量约为 1×10⁵ 个，每孔 DMEM 培养液体积为 1ml，于 5% CO₂，37℃ 培养箱中继续培养。

（3）细胞照光：待细胞密度达到 80-90% 时进行照光处理，对细胞进行梯度 UVA 照射，剂量分别为 0、10、20、30J/cm²，照射后于培养箱培养 24 小时后进行小分子荧光染料染色。

（4）配制 YO-PRO-1/PI 检测工作液：每 1ml 检测工作液含 YO-PRO-1（1000×）1μl、PI（1000×）1μl、检测缓冲液 998μl。

（5）染色：吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 次，每孔加入 500μl 的 YO-PRO-1/PI 检测工作液，37℃ 避光孵育 20 分钟。孵育结束后，在荧光显微镜下观察荧光效果并拍照。

2.2.9 显微镜下观察细胞形态学变化

（1）细胞计数。

(2) 细胞铺板: 将处于对数生长期的成纤维细胞接种于 6 孔板, 细胞数量为 10 万个细胞每孔, 设置 3 个副孔, 每孔 DMEM 培养液体积为 2ml, 于 5% CO₂, 37℃培养箱中继续培养。

(3) 细胞照光: 待细胞密度达到 80-90%时进行照光处理, 对细胞进行梯度 UVA 照射, 剂量分别为 0、10、20、30J/cm², 照光后将细胞放回培养箱中继续培养。

(4) 镜下观察: 照光 6 小时后, 拿出细胞培养板, 置于显微镜下观察细胞形态变化, 并且留取照片。

2.2.10 NAC 药物配制

NAC 分子式为 C₅H₉NO₃S, 分子量 163.19, 称量 0.1gNAC 粉末, 加入适量体积的 PBS 将其定容至 1.23ml, 配制浓度为 500mM 的 NAC 溶液, 置于-40℃温度下储存。

2.2.11 MTS 法检测不同浓度 NAC 对细胞活力的影响

(1) 细胞计数、细胞铺板: 同 2.2.6。

(2) 细胞加药: 在显微镜下观察到铺板后的细胞密度达到 80-90%时, 对细胞进行加药处理, 分为 5 组不同浓度, 浓度分别为 0、1.25、2.5、5、10mM, 加药后将细胞放回培养箱中继续培养。

(3) 检测 MTS 细胞活力: 于培养箱培养 24 小时后检测细胞的增殖活性。分别于每孔加入 10μl MTS 试剂, 37℃培养箱中继续培养 3 小时后, 酶标仪检测 490nm 处波长的吸光值。

(4) 数据统计: 默认对照组细胞活力为 100%, 其他组的细胞活力百分比为 (各组 490nm 处吸光值/对照组 490nm 处吸光值) × 100%。

2.2.12 细胞照光后加 NAC 处理进行 MTS 法检测细胞活力

(1) 细胞计数、细胞铺板: 同 2.2.6。

(2) 细胞照光及加药: 在显微镜下观察到铺板后的细胞密度达到 80-90%时, 对细胞进行 UVA 照射, 剂量为 30J/cm², 照射后将细胞放回培养箱中继续培养, 其中加 NAC 处理组在照光后加入 NAC 继续放回培养箱中培养。

(3) 检测 MTS 细胞活力: 于培养箱培养 24 小时后检测细胞的增殖活性。分别于每孔加入 10μl MTS 试剂, 37℃培养箱中继续培养 3 小时后, 酶标仪检测 490nm 处波长的吸光值。

(5) 数据统计: 默认对照组细胞活力为 100%, 其他组的细胞活力百分比为 (各组 490nm 处吸光值/对照组 490nm 处吸光值) \times 100%。

2.2.13 细胞照光后加 NAC 处理检测细胞上清液乳酸脱氢酶释放百分比

(1) 细胞计数。

(2) 细胞铺板: 将处于对数生长期的成纤维细胞, 接种于 96 孔板, 细胞数量为 5000 个细胞每孔, 每组设置 3 个副孔, 每孔 DMEM 培养液体积为 100 μ l, 于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。细胞分组为: 背景空白对照组、背景加 NAC 空白对照组, 未照光对照组、未照光最大酶活性对照组、未照光加 NAC 组、照光处理组及照光后加 NAC 处理组。

(3) 细胞照光: 待细胞密度达到 80-90% 时进行照光处理, 对细胞进行 UVA 照射, 剂量为 30J/cm², 照光后各孔加入 200 μ l 无血清培养基, 放回培养箱中继续培养, 其中需要加 NAC 的处理组在照光后加入 NAC 后继续放回培养箱中培养。

(4) 在到达预定检测时间点的前 1 小时从培养箱中取出细胞培养板, 在“未照光处理最大酶活性对照组”中加入试剂盒的 LDH 释放试剂组分, 加入体积为 10% 的原有培养液体积。加入 LDH 释放试剂后, 在孔板内反复轻柔吹打数次进行混匀, 然后继续在细胞培养箱中孵育。

(5) 到达预定检测时间时, 将培养板用多孔板离心机 400g 离心 5 分钟。分别取 120 μ l 各孔的上清液, 加入到一新的 96 孔板相应孔中, 在孵育后进行样品测定。

(6) 样品测定: 各孔分别加入 60 μ l LDH 检测工作液, 混匀。室温用铝箔包裹后置于水平摇床缓慢摇动 30 分钟, 然后用酶标仪在 490nm 处测定吸光度。

(7) 计算: 各孔吸光度减去背景空白对照孔吸光度, 其中加药组吸光度减去背景加 NAC 空白对照组吸光度, 各组 LDH 释放百分比 (%) = (处理组吸光度 - 未照光对照孔吸光度) / (细胞最大酶活性的吸光度 - 未照光对照孔吸光度) \times 100。

2.2.14 细胞照光后加 NAC 处理进行 YO-PRO-1/PI 荧光细胞双染实验

(1) 细胞计数、细胞铺板: 同 2.2.8。

(2) 细胞照光: 待细胞密度达到 80-90% 时进行照光处理, 对细胞进行 UVA 照射, 剂量为 30J/cm², 照射后于培养箱继续培养, 其中加 NAC 处理组在照光后加入 NAC 后继续放回培养箱中培养, 24 小时后进行小分子荧光染料 YO-PRO-1/PI 染色。

(3) 配制 YO-PRO-1/PI 检测工作液: 每 1ml 检测工作液含 YO-PRO-1 (1000 \times) 1 μ l、PI (1000 \times) 1 μ l、检测缓冲液 998 μ l。

(4) 染色: 吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 每孔加入 500 μ l 的 YO-PRO-1/PI 检测工作液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 20 分钟。孵育结束后, 在荧光显微镜下观察荧光染色效果并拍照。

2.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 对实验结果进行统计分析。应用单因素方差分析 (One-way analysis of variance, one-way ANOVA) 进行多组统计学分析。实验数据来自至少三次独立实验。结果表示为均数 \pm 标准差。 P 值小于 0.05 具有统计学意义。应用 GraphPad Prism 9 和 Photoshop 等软件进行绘图。使用 Image J 对图像进行分析。

3 结果

3.1 UVA 引起真皮成纤维细胞发生细胞焦亡的形态学改变

为了初步评估 UVA 照光后皮肤成纤维细胞是否发生细胞焦亡, 分别取对数生长期的永生化人皮肤成纤维细胞 (HSF) 和 4-8 代的原代人真皮成纤维细胞 (HDF) 平铺于 12 孔板中, 待细胞密度达到 80-90% 后, 对细胞进行不同剂量的 UVA (0、10、20、30J/cm²) 照光处理, 于光学显微镜下观察不同剂量 UVA 处理 6 小时后细胞形态改变。如图 1.1 所示, 显微镜下观察 UVA 照光后 HSF 细胞 (A) 和 HDF 细胞 (B) 形态改变。可见在 UVA 剂量为 20J/cm² 时, 两种细胞均出现焦亡形态变化, 具体表现为细胞肿胀膨大, 并且有许多气泡状突出物, 在 UVA 剂量为 30J/cm² 时, 发生细胞焦亡的比例明显升高, 提示中高剂量 UVA 照光后, 真皮成纤维细胞发生细胞焦亡。

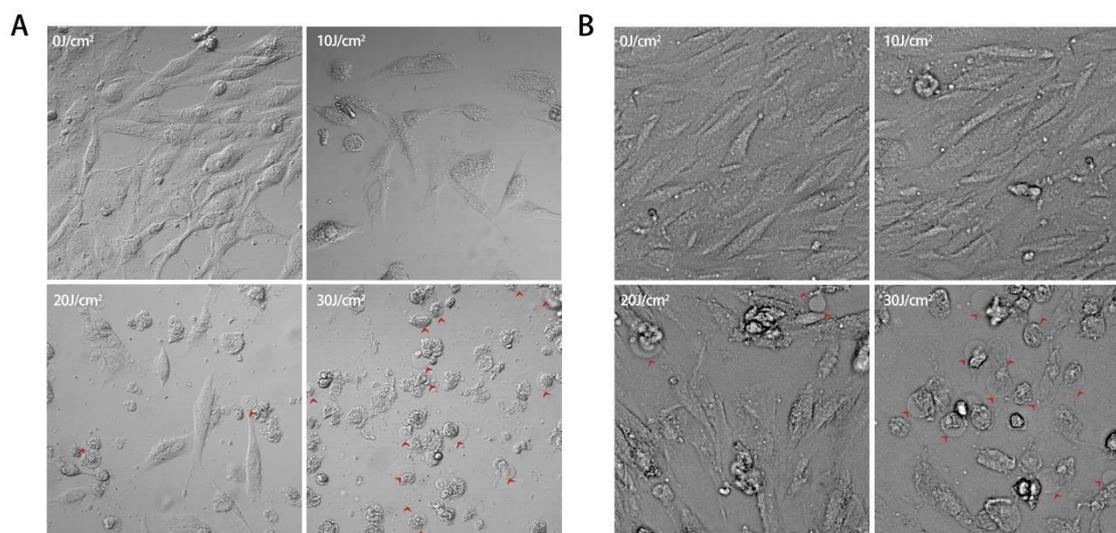


图 1.1 光镜下 UVA 处理后 HSF 及 HDF 细胞形态改变

光镜下观察到 UVA 照光后 HSF 细胞 (A) 和 HDF 细胞 (B) 表现出细胞肿胀膨大, 气球样改变的焦亡细胞形态改变。红色箭头表示焦亡细胞的气泡状突出物形态特征。

3.2 不同剂量 UVA 导致成纤维细胞活力改变

既往研究表明, UVA 对成纤维细胞的损伤程度呈剂量依赖性改变。在本研究中, 为了明确不同剂量 UVA 对皮肤成纤维细胞的损伤程度, 分别取对数生长期的 HSF 细胞和 4-8 代的 HDF 细胞平铺于 96 孔板中, 待细胞密度达到 80-90% 后, 对细胞进

行不同剂量的 UVA (0、10、20、30J/cm²) 照光处理, 在照光后 24 小时应用 MTS 法检测细胞活力, 如图 1.2 所示, 照光后细胞活力明显下降, 且呈剂量依赖关系。

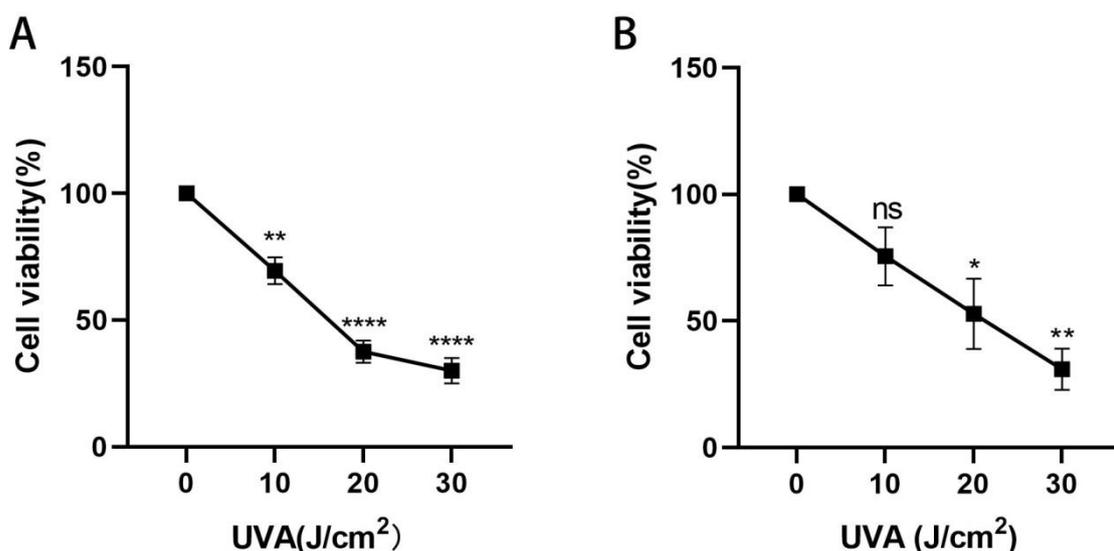


图 1.2 不同剂量 UVA 对成纤维细胞活力的影响

HSF 细胞 (A) 和 HDF 细胞 (B) 结果显示, UVA 剂量越大对细胞活力损伤也越大, 呈剂量依赖性。结果表示为均数±标准误。P 值小于 0.05 具有统计学意义, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$, ****表示 $P < 0.0001$ 。

3.3 不同剂量 UVA 导致成纤维细胞 LDH 释放改变

细胞焦亡造成的细胞膜结构的破坏会导致细胞浆内的酶释放到培养液里, 从焦亡细胞中释放到培养液中的乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性, 可以间接反应细胞发生焦亡的程度, 因此 LDH 释放常被用于细胞焦亡检测。不同剂量 UVA 处理成纤维细胞, 照光后 48 小时检测细胞上清中 LDH 释放活性。如图 1.3 所示, 随着 UVA 剂量升高, LDH 释放活性也呈剂量依赖性升高。而 HSF 细胞及 HDF 细胞在 UVA=10J/cm² 时, LDH 释放活性与对照组无统计学差异, 可能说明低剂量 UVA 无法诱导成纤维细胞发生焦亡。而在 UVA=20J/cm² 时, HSF 细胞 LDH 释放活性与对照组有统计学差异, 而 HDF 细胞无统计学差异, 可能说明永生化人皮肤成纤维细胞比原代成纤维细胞在 UVA 照光后更易发生细胞焦亡。

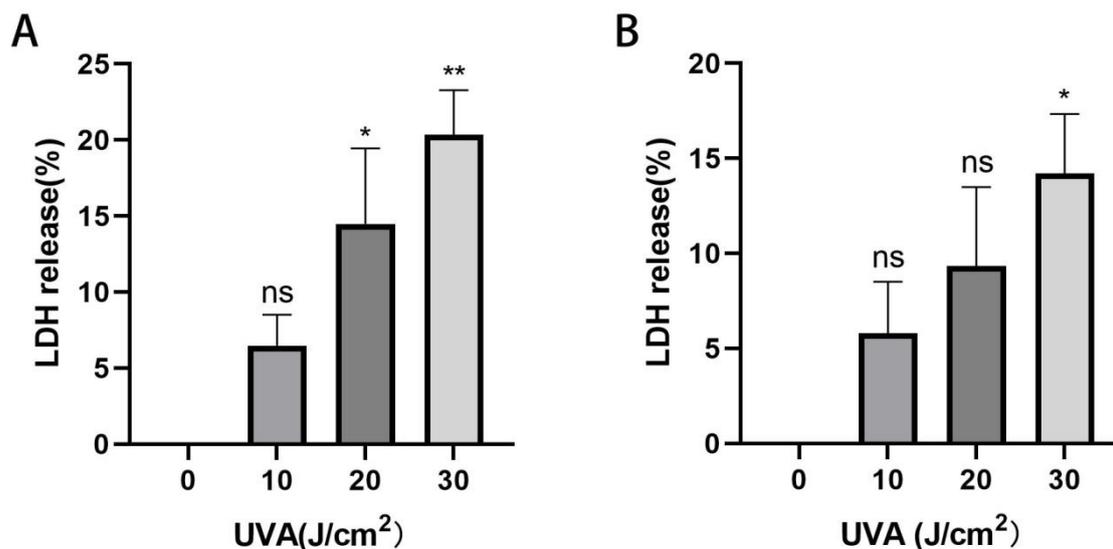
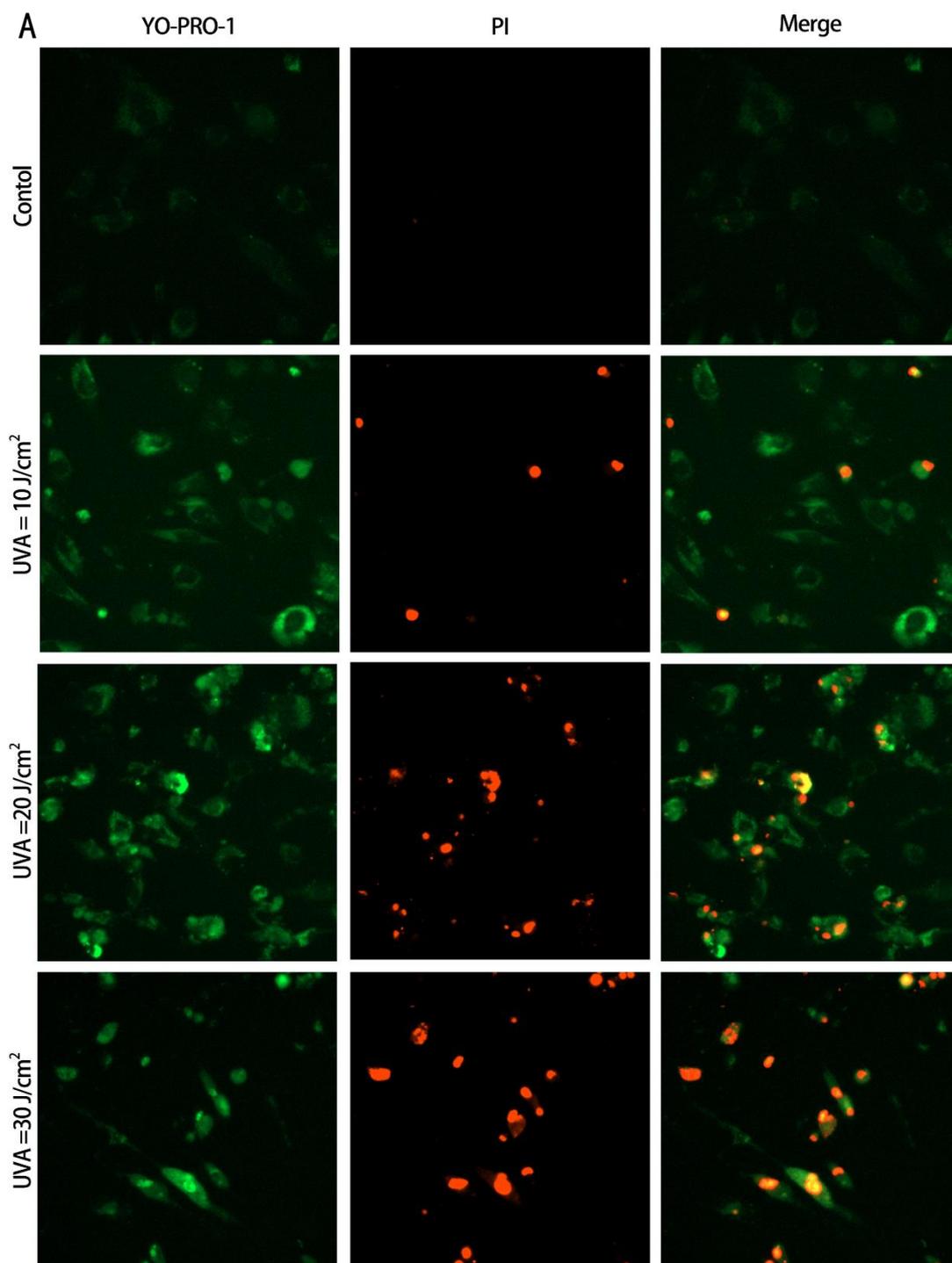


图 1.3 不同剂量 UVA 对成纤维细胞 LDH 释放活力的影响

UVA 剂量越大, LDH 释放活力的百分比也越高, 呈剂量依赖性。UVA 剂量为 30 J/cm² 时, HSF 细胞 (A) 和 HDF 细胞 (B) 均与对照组有统计学差异。结果表示为均数±标准误。P 值小于 0.05 具有统计学意义, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

3.4 不同剂量 UVA 对成纤维细胞损伤程度的影响

YO-PRO-1 是一种对凋亡细胞的细胞膜有通透性的 DNA 绿色荧光染料, 常用于细胞凋亡的检测。PI 是一种核酸红色荧光染料, 只能染色细胞膜完整性丧失的死亡细胞, 并与核酸结合发出明亮的红色荧光。因此, YO-PRO-1 与碘化丙啶(PI)联合使用, 可以同时进行凋亡细胞和焦亡细胞的检测, 根据染色情况, 我们将细胞分为三种: (1) 活细胞为 YO-PRO-1 和 PI 双阴性细胞; (2) 凋亡细胞为 YO-PRO-1 阳性而 PI 阴性细胞; (3) 焦亡细胞或坏死细胞为 YO-PRO-1 和 PI 双阳性细胞。对不同剂量 UVA 处理后 24 小时的成纤维细胞进行荧光染色, 荧光显微镜下观察细胞的损伤情况。结果如图 1.4 所示, 不同剂量 UVA 处理后成纤维细胞均存在双染阳性细胞, 随着 UVA 剂量增大, 细胞损伤加重, 双染阳性细胞比例增大。



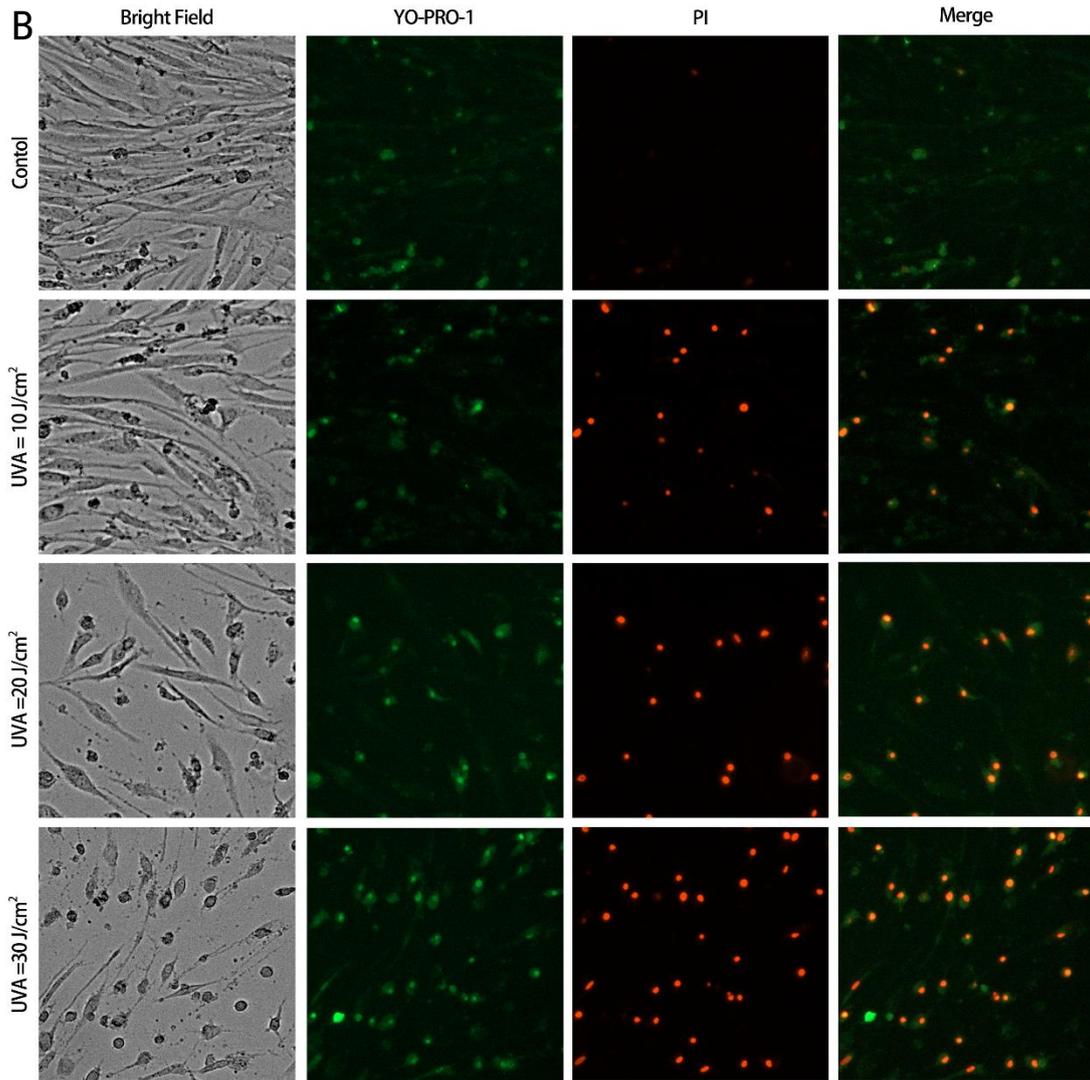


图 1.4 YO-PRO-1/PI 双染检测 UVA 对成纤维细胞损伤程度的影响

荧光显微镜观察 UVA 处理后，经 YO-PRO-1（绿色）、PI（红色）双染的细胞。A. HSF 细胞染色。B. HDF 细胞明场形态和染色。YO-PRO-1 和 PI 双染阳性细胞比例与 UVA 呈剂量依赖性。明场下观察细胞形态，随着 UVA 剂量升高，HDF 细胞数量减少，且形状由长梭形逐渐变短变圆。

3.5 氧化应激参与 UVA 诱导成纤维细胞焦亡

为了研究 UVA 诱导成纤维细胞细胞焦亡激活的过程中有无氧化应激参与，我们加入抗氧化剂 NAC 来对细胞内氧化应激产生抑制作用。

首先，以不同浓度的 NAC（1.25mM、2.5mM、5mM、10mM）对成纤维细胞进行处理，加药处理 24 小时后，用 MTS 法检测细胞活力以确定后续实验使用 NAC

浓度。如图 1.5 所示，NAC 浓度在 10mM 以内均未对细胞产生毒性，结合其他相关研究使用浓度，我们选择较为常用的 5mM 作为后续实验使用浓度。

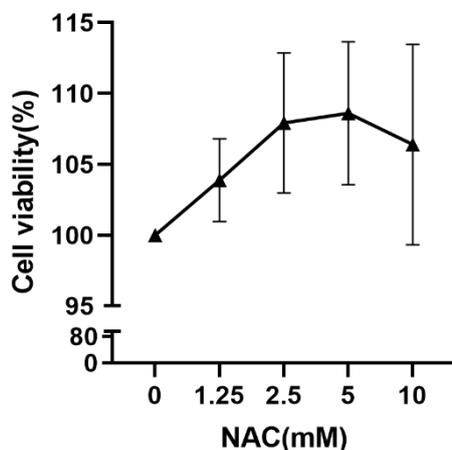


图 1.5 不同浓度 NAC 对细胞活力影响

MTS 法检测 HDF 细胞活力，加药 24 小时后，10mM 内浓度的 NAC 均未对 HDF 细胞产生细胞毒性。

在成纤维细胞照光处理后，在 NAC 处理组的细胞培养液中加入适量体积的 NAC 溶液（500mM），使其稀释 100 倍，终浓度为工作浓度（5mM），对照组的细胞培养液中加入等体积的 PBS 溶液。24 小时后对细胞进行检测，应用 MTS 法检测细胞活力，如图 1.6 所示，加 NAC 抑制氧化应激后，细胞活力较单独照光组明显上升。乳酸脱氢酶释放活力检测显示，抑制氧化应激后，细胞照光后释放乳酸脱氢酶显著降低。YO-PRO-1/PI 双荧光染色结果显示，HDF 细胞照光后，YO-PRO-1/PI 双染阳性细胞比例明显增加，加 NAC 抑制氧化应激处理后，YO-PRO-1/PI 双染阳性细胞比例较单独照光组明显降低，而 YO-PRO-1 单染阳性细胞比例也较单独照光组降低。表明经 NAC 抗氧化处理后，成纤维细胞经 UVA 照光后的细胞焦亡表型受到抑制，说明氧化应激参与了 UVA 诱导成纤维细胞的焦亡。

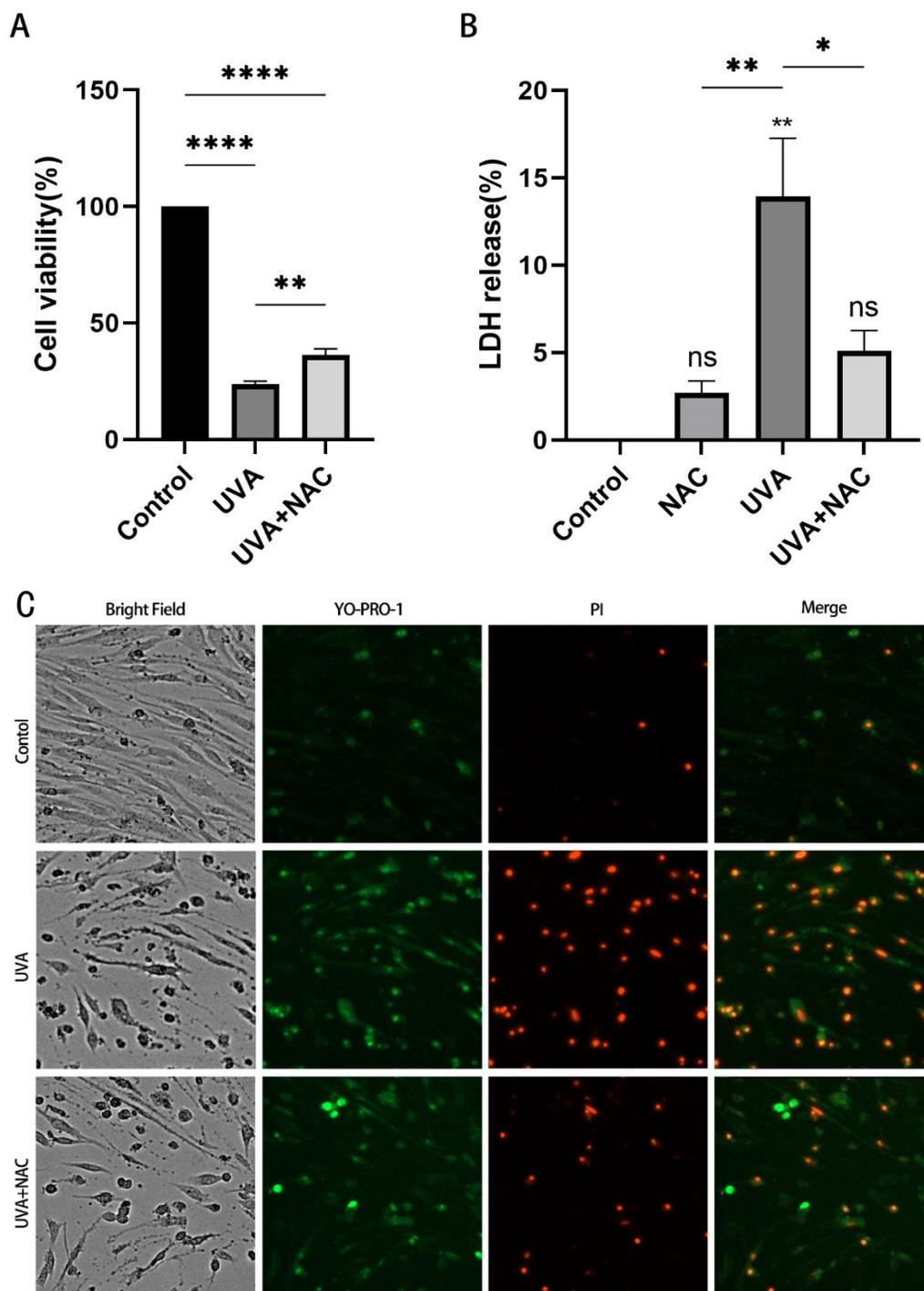


图 1.6 氧化应激参与 UVA 诱导成纤维细胞的细胞焦亡

A. MTS 法检测细胞活力，NAC 可以抑制 UVA 导致的细胞活力下降。B. 乳酸脱氢酶活力释放检测细胞损伤，NAC 可以抑制 UVA 导致的细胞膜损伤。C. YO-RPO-1/PI 染色显示，NAC 可以同时抑制细胞凋亡和细胞焦亡。

4 讨论

在皮肤光损伤中，急性中高剂量的 UVA 引起成纤维细胞的损伤和功能失调，继而出现真皮结构紊乱，产生皮肤光老化表现^[14]。成纤维细胞作为 UVA 的主要靶点，我们在本研究中重点关注单次中高剂量的 UVA 对其的细胞损伤，并想探究细胞焦亡是否在其中发生，因此我们建立了体外 UVA 照射成纤维细胞的光损伤模型。

有研究发现以低剂量 $5\text{J}/\text{cm}^2$ UVA 单次照射成纤维细胞时，细胞活力和形态未发生改变，而在大于 $10\text{J}/\text{cm}^2$ 的剂量，细胞开始出现活力下降以及形态变化^[14]。有更多文献支持，在使用大于 $10\text{J}/\text{cm}^2$ 剂量对成纤维细胞进行单次 UVA 照射时，成纤维细胞出现细胞活力下降以及细胞凋亡分子表达^[16,20]。我们以 $0\text{J}/\text{cm}^2$ 、 $10\text{J}/\text{cm}^2$ 、 $20\text{J}/\text{cm}^2$ 、 $30\text{J}/\text{cm}^2$ 不同剂量 UVA 分别对永生化人真皮成纤维细胞和原代人真皮成纤维细胞进行照射，与其他文献报道一致，我们同样发现在 $10\text{J}/\text{cm}^2$ 时细胞出现活力下降、细胞形态变化等细胞损伤表现，但在更高剂量下发现了成纤维细胞在照光后出现了细胞焦亡的表现，在 $20\text{J}/\text{cm}^2$ 这一剂量细胞开始出现细胞焦亡形态学改变，而在 $30\text{J}/\text{cm}^2$ 细胞焦亡比例明显升高，说明成纤维细胞焦亡与 UVA 呈剂量依赖性。细胞活力和乳酸脱氢酶释放实验结果与细胞焦亡形态学表现相符。因此，我们推测中低剂量的 UVA ($<20\text{J}/\text{cm}^2$) 下，细胞死亡的主要方式不是细胞焦亡，而高剂量的 UVA ($>20\text{J}/\text{cm}^2$) 才能诱发成纤维细胞出现细胞焦亡。因此我们猜测在某一剂量节点，细胞内损伤达到激活细胞焦亡通路的阈值，实现细胞死亡形式的转变，这一节点可能是研究 UVA 引起细胞焦亡激活机制的关键。

在研究中，我们发现 UVA 剂量过大，细胞损伤较重时，细胞主要以细胞焦亡的形式死亡。在既往细胞焦亡的研究中，细胞以焦亡的形式死亡后会释放细胞内容物和炎症因子，加剧周围细胞和组织炎症。据此，我们推测大剂量 UVA 引起皮肤成纤维细胞焦亡可能是室外暴晒后短期内出现皮肤红肿等急性炎症表现的原因之一。我们仅在细胞水平进行了实验，未进行体内实验或多种细胞共培养，因此对在细胞发生焦亡后对组织和其他细胞的影响的研究上具有局限性。

另外，在两种细胞照光后的细胞焦亡研究中，我们也发现了差异。相同剂量下，永生化人皮肤成纤维细胞表现出更重的细胞损伤，其焦亡表现也更为明显，而原代人真皮成纤维细胞对 UVA 的耐受性比永生化细胞更强。我们认为产生这种细胞间的差异可能存在两种原因：一是原代细胞作为从人新鲜包皮组织中提取的细胞，因其提取来源于不同个体，因此存在着由于个体差异带来的细胞差异；二是有文献表明

与自发永生化角质形成细胞 HaCaT 细胞系相比, 由 HPV16 病毒 E6 和 E7 基因构建的永生化角质形成细胞 iHFK 细胞系对于引起细胞毒性化学物质更为敏感^[21], 且与 HaCaT 细胞相比, iHFK 对 ROS 诱导的细胞毒性的敏感性增加^[22]。而在本研究中, 我们所使用的细胞系为 SV40 病毒构建的永生化人皮肤成纤维细胞, 结合前人研究, 我们推测永生化细胞对于 UVA 的耐受性弱于原代细胞, 是否与病毒构建永生化方式相关, 是否病毒构建的永生化细胞对于 ROS 参与的细胞应激条件更敏感, 这些推测还有待我们进一步研究。

我们课题组前期已经明确 UVA 照射成纤维细胞会产生过量 ROS, 从而对细胞造成损伤。在本部分研究中, 我们使用 NAC 减少细胞内 ROS 产生, 发现对 UVA 引起的细胞焦亡表现起到了抑制作用, 因此我们得出结论, UVA 通过引起细胞内氧化应激来诱导成纤维细胞发生细胞焦亡。其他文献也有报道在某些条件下, 氧化应激参与了激活细胞焦亡。尼古丁通过刺激 ROS 激活 NLRP3 炎性小体诱导内皮细胞焦亡可能是促进动脉粥样硬化的细胞机制^[23]。苯并芘通过 ROS/NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 信号通路致肝细胞发生细胞焦亡而导致肝损伤^[24]。铁激活 ROS 可以通过 Tom20/Bax/caspase-3/GSDME 途径诱导黑素瘤细胞发生焦亡^[25]。在小鼠骨髓来源的巨噬细胞中, ROS 通过对 GSDMD 进行氧化修饰提高了其被 caspase-1 剪切的效率, 可能是 ROS 增强 NLRP3 依赖的细胞焦亡的机制^[26]。因此, 氧化应激作为 UVA 诱导真皮成纤维细胞发生细胞焦亡的关键因素, 很有可能参与其中焦亡通路的激活, 针对这一点, 我们需要在下一部分实验中进行进一步验证。

在本部分研究中, 我们在形态学水平、细胞活力和细胞损伤对细胞进行了相关检测, 首次发现高剂量 UVA 照射可引起成纤维细胞发生细胞焦亡, 但其中引起细胞焦亡的机制还未明确, 因此, 下一部分实验我们将关注 UVA 引起成纤维细胞焦亡的具体分子机制, 以及氧化应激是否对参与成纤维细胞焦亡的分子通路产生了影响。

5 结论

UVA 照射通过氧化应激引起皮肤成纤维细胞发生细胞焦亡。

第二部分：UVA 通过线粒体途径激活 CASP3/GSDME 通路诱导成纤维细胞焦亡

1 前言

细胞焦亡的效应蛋白——Gasdermin 蛋白家族成员，除 PJVK 外，都在其 gasdermin-N 结构域具有内源性的致细胞死亡活性，在未剪切状态下，这种诱导细胞死亡的活性被 gasdermin-C 结构域所抑制^[27]。当受到外界刺激后，经过一系列通路激活，gasdermin-N 和 C 结构域间的蛋白水解，释放出 gasdermin-N 结构域，gasdermin-N 结构域移位到细胞膜上形成低聚体使胞膜穿孔^[10,11]。目前研究比较多的焦亡效应分子为 GSDMD，其激活的分子通路可分为经典途径和非经典途径^[28]，经典途径通常由炎症小体组装介导，大多数炎症小体由以下部分组成：NOD 样受体（NLRs）、ASC 和 caspase-1^[29]。目前研究较多具有代表性的 NOD 样受体为 NLRP3 分子，其组装成炎症小体后，对 pro-caspase-1 剪切激活，形成 caspase-1，活化的 caspase-1 一方面可剪切 GSDMD 形成 N 端和 C 端，另一方面切割 IL-1 β 和 IL-18 的前体，最终通过 GSDMD-N 形成的孔隙促进水分子内流及细胞内容物外流，和从孔内释放成熟的 IL-1 β /IL-18，驱动细胞焦亡，诱发并扩大炎症^[30,31]。非经典途径由脂多糖（LPS）激活 caspase-4/5/11^[32]，后者裂解 GSDMD 形成 N 端，发挥诱导焦亡的作用^[33]。除 GSDMD 外，GSDME 也在近几年被发现可引起焦亡，研究发现，活化的 caspase-3 在 Asp270 处剪切 GSDME，以产生 GSDME-N 端，GSDME-N 靶向细胞膜后引起细胞焦亡的发生^[34,35]。

近几年发现皮肤组织细胞在外界刺激因素下，可发生细胞焦亡。登革热病毒 DENV-1 和 DENV-2 型可通过激活真皮成纤维细胞 NLRP3 炎症小体通路激活细胞焦亡反应，来调节细胞中的病毒复制^[36]。Gasdermin B 在银屑病皮损中表达降低，其在永生化角质形成细胞（HaCaT）中表达下调可以抑制细胞增殖、促进细胞凋亡^[37]。双酚 A 通过激活 caspase-1 诱导真皮成纤维细胞焦亡进而加重皮肤老化和皮肤炎症^[38]。在 UVB 对于表皮损伤研究中，有研究发现 UVB 辐射可引起 HaCaT 细胞发生 GSDME 激活的细胞焦亡^[39,40]。目前对于 UVA 是否会引起真皮成纤维细胞焦亡及其发生机制还未见报道，这一部分的研究领域的信息还十分有限，针对此问题的研究有助于拓展这一领域的发现。

有研究发现 UVB 通过激活 GSDME 引起 HaCaT 细胞焦亡^[41]，我们认为 UVA 很有可能通过类似途径引起成纤维细胞焦亡，而 GSDME 又被 caspase-3 所剪切激活。Caspase-3 过去被认为是重要的凋亡蛋白，它是内源性凋亡途径和外源性凋亡途径共同的效应分子^[42]。内源性途径又称为线粒体途径，由内源性应激激活，导致 Bax/Bak 介导线粒体外膜上形成孔，引起线粒体功能障碍，从而释放促凋亡蛋白如细胞色素 C (Cyto c)、HtrA2/Omi 到胞浆中。胞浆中的 Cyto c 与凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合，导致 Caspase-9 前体的募集并激活，活化的 caspase-9 随后剪切 caspase-3/7 前体，导致细胞凋亡^[43]。Caspase-3 将线粒体途径凋亡与细胞焦亡联系起来，即线粒体途径凋亡可以通过活化 caspase-3 在 GSDME 介导的细胞焦亡中起重要作用。雷公藤内酯 (TPL) 通过抑制线粒体己糖激酶 II 导致 BAD/Bax-caspase-3 级联活化，通过 caspase-3/GSDME 诱导焦亡作用来清除头颈部癌细胞^[44]。大气压冷等离子体通过 ROS/JNK 激活线粒体途径凋亡 Bax/ Cyto c/caspase 级联活化，剪切 GSDME，引起高表达 GSDME 的肿瘤细胞发生焦亡^[45]。洛铂诱导 ROS/JNK/ bax 线粒体途径凋亡和 caspase-9/-3 的激活，继而通过下游 GSDME 介导的焦亡对结肠癌起到治疗作用^[46]。因此，我们猜测 UVA 是否可以通过激活线粒体途径凋亡，继而引起真皮成纤维细胞焦亡的发生。

在本研究的第一部分中，我们已经发现 UVA 照射处理可以诱导成纤维细胞出现细胞焦亡的表型改变，因此为了进一步探究参与此过程的分子及相关通路，我们分别在转录水平及蛋白水平对目前已知的参与细胞焦亡发生的部分分子进行验证，并对参与其中的通路进行分子干预，予以进一步验证。为了探究氧化应激对焦亡通路的影响，对细胞加入 NAC 处理以减少细胞内 ROS，并在蛋白水平检测照光后加药对细胞内焦亡分子的改变。另外，我们通过检测线粒体膜电位和在蛋白水平检测线粒体途径凋亡分子的表达，明确 UVA 是否会诱导成纤维细胞发生线粒体途径凋亡以及其与细胞焦亡的发生有无时间顺序。在此基础上，我们进一步用 NAC 对细胞进行处理，以明确 UVA 是否通过氧化应激使细胞内的线粒体途径凋亡激活。本研究主要探索了 UVA 引起成纤维细胞焦亡激活的分子机制，为针对该通路进行靶向干预可以作为临床防治光损伤的应用提供了新思路。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验对象

(1) 永生化人皮肤成纤维细胞 (HSF), 购于赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。

(2) 人真皮成纤维细胞 (HDF), 提取于人包皮组织, 来自于中国医科大学附属第一医院泌尿外科手术室。

2.1.2 主要试剂

PBS 缓冲液 (美国, Biosharp 公司)

青霉素/链霉素抗生素溶液 (以色列, Biological Industries 公司)

DMEM 高糖培养基 (中国, 道鹏生物科技公司)

胰蛋白酶 (以色列, Biological Industries 公司)

胎牛血清 (中国, 道鹏生物科技公司)

无血清细胞冻存液 (中国, 新赛美生物科技公司)

RNA 提取试剂盒 (中国, 艾科瑞生物公司)

EvoM-MLV 反转录试剂盒 (中国, 艾科瑞生物公司)

SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (中国, 艾科瑞生物公司)

PCR 引物 (美国, Invitrogen 公司)

TE 缓冲液 (中国, 索莱宝公司)

线粒体膜电位检测试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)

RIPA 裂解液 (中国, 碧云天生物技术公司)

PMSF (中国, 索莱宝公司)

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)

SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (中国, Biosharp 生物公司)

聚丙烯酰胺凝胶上层胶红色染料 (中国, 赛维尔生物公司)

过硫酸铵 APS 粉末 (中国, 碧云天生物技术公司)

TEMED (中国, 碧云天生物技术公司)

无水乙醇 (中国, 麦克林试剂公司)

Tris-Base (中国, 索莱宝公司)

SDS (中国, 索莱宝公司)
甘氨酸 (中国, 索莱宝公司)
甲醇 (中国, 麦克林试剂公司)
SDS-PAGE 上样缓冲液还原型 (中国, 康为世纪生物公司)
预染彩色蛋白 Marker (中国, 铂莱生物公司)
PVDF 膜 (美国, Millipore 公司)
10×TBST 缓冲液 (中国, 索莱宝公司)
脱脂奶粉 (中国, 索莱宝公司)
WB 专用一抗二抗稀释液 (中国, 爱必信生物公司)
GAPDH 抗体 (中国, Proteintech 公司)
NLRP3 抗体 (美国, Abcam 公司)
Caspase-4 抗体 (美国, Abcam 公司)
Caspase-1 抗体 (中国, Proteintech 公司)
GSDMD-N 抗体 (美国, Abcam 公司)
GSDME 抗体 (美国, Abcam 公司)
Cleaved Caspase-3 抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司)
PARP 抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司)
Caspase-9 抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司)
Bax 抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司)
Cyto c 抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司)
Bcl-2 抗体 (中国, 景杰生物公司)
过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗抗体 (中国, Proteintech 公司)
过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗抗体 (中国, Proteintech 公司)
超敏 ECL 化学发光试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)
NAC 抗氧化剂 (中国, 碧云天生物技术公司)
CASP3 敲低质粒和 shCASP3-NC 质粒 (中国, 吉凯基因)
QuickShuttle-Basic 转染试剂 (中国, 博奥龙免疫技术公司)
无内毒素质粒大提试剂盒 (中国, 天根生化科技公司)
TOP10 感受态细胞 (中国, 索莱宝公司)
氨基青霉素钠 (中国, 碧云天生物技术公司)
LB 液体培养基 (中国, 索莱宝公司)

LB 固体培养基（中国，索莱宝公司）

2.1.3 主要仪器

-80℃深低温冰箱（美国，Thermo 公司）

-20℃低温冰箱（德国，西门子公司）

4℃冰箱（美国，Thermo 公司）

微量移液器（美国，Rainin 公司）

恒温水浴箱（美国，Thermo 公司）

恒温二氧化碳细胞培养箱（美国，Thermo 公司）

生物安全操作台（美国，Thermo 公司）

光学显微镜（日本，Olympus 公司）

Sorvall ST 40R 台式冷冻离心机（美国，Thermo 公司）

UV 801KL（德国，Waldmann 公司）

酶标仪（美国，BioTek 公司）

水平摇床（中国，其林贝尔仪器公司）

涡旋振荡器（中国，其林贝尔仪器公司）

去离子水制备系统（美国，Millipore 公司）

台式离心机（美国，Thermo 公司）

NanoDrop-1000 分光光度计（美国，Thermo 公司）

ABI 9700 PCR 扩增仪（美国，Applied Biosystems 公司）

QuantStudio 1 型实时荧光定量 PCR 系统（美国，Thermo 公司）

蛋白凝胶电泳槽、电泳仪和转膜槽（美国，Bio-Rad 公司）

化学发光图像分析系统（中国，天能公司）

共聚焦显微镜（日本，Olympus 公司）

荧光显微镜（美国，BioTek 公司）

2.2 方法

2.2.1 细胞复苏、换液、传代与冻存

同第一部分。

2.2.2 细胞计数、铺板与照光

同第一部分。

2.2.3 RNA 提取及浓度检测

(1) 吸出 60mm 细胞培养皿中的培养基，将细胞用 PBS 洗两次后，向培养皿中加入 600 μ l Buffer RLS 裂解液，移液器反复吹打至混合液无明显沉淀，室温静置 2 分钟后，将混合液收集到 1.5ml 无酶 EP 管内。

(2) 向混合液中加入等体积 70%乙醇，移液器反复吹打混匀，待混合液被吹打至非粘稠状态，将上述混合液移入 Universal RNA Mini Column 中，室温 12000rpm 离心 1 分钟，然后弃收集管内滤液。

(3) 向吸附柱中加入 600 μ l Buffer RWA 溶液，室温 12000rpm 离心 1 分钟，然后弃收集管内滤液。

(4) 向吸附柱中加入 650 μ l Buffer RWB 溶液，室温 12000rpm 离心 1 分钟，然后弃收集管内滤液。

(5) 进行 DNA 酶消化，按比例配制 DNase I 反应液并混匀（每孔配制体积：DNase I 4 μ l、10 \times DNase I Buffer 5 μ l、RNase free water 41 μ l），向吸附柱膜中央加入 50 μ l DNase I 反应液，室温静置 15 分钟；向吸附柱中加入 350 μ l Buffer RWB 溶液，室温 12000rpm 离心 1 分钟，然后弃收集管内滤液。

(6) 加入 650 μ l Buffer RWB，室温 12000rpm 离心 1 分钟，然后弃收集管内滤液。

(7) 将吸附柱安置于新的 2.0ml 收集离心柱上，室温 12000rpm 离心 2 分钟，然后弃收集管内滤液。

(8) 将吸附柱安置于新的 1.5ml RNase Free Tube 上，在吸附柱膜的中央处，加入 50 μ l 无酶水，室温静置 5 分钟，然后 12000rpm 离心 2 分钟用以洗脱 RNA。

(9) 应用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。

(10) 提取的 RNA 样品置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.2.4 逆转录

(1) 测定好各样本 RNA 浓度后，将所有组样本 RNA 总质量统一为 1000ng，计算出各组逆转录所需加入 RNA 的体积，并用无酶水补齐体积至 16 μ l，然后每组加 4 μ l Evo M-MLVRT Master Mix 试剂。

(2) 逆转录反应条件：37 $^{\circ}$ C 15 分钟；85 $^{\circ}$ C 5 秒；4 $^{\circ}$ C。

(3) cDNA 样品置于-40 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.2.5 实时定量 PCR

(1) PCR 扩增使用艾科瑞 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 II，按照试剂盒说明书流程进行操作，使用 96 孔板进行扩增反应与检测。每孔反应体系 (20 μ l) 如下：

表 1 PCR 反应体系

| 试剂名称 | 加样体积 |
|--|-------------|
| 2 \times SYBR Green Pro Taq HS Premix II | 10 μ l |
| Template | 2 μ l |
| Primer F | 0.4 μ l |
| Primer R | 0.4 μ l |
| ROX Reference Dye (4 μ M) | 0.4 μ l |
| RNase free water | 6.8 μ l |

(2) 加样：先将反应体系中除 Template 组分混合后加入 96 孔板，再将各组 cDNA 分别加入对应孔中，每组设置 3 个副孔，然后封板，在离心机中于 3000rpm 离心 5 分钟。

(3) 上机进行 qRT-PCR 反应程序：程序如下。

表 2 PCR 反应条件

| 步骤 | 温度 ($^{\circ}$ C) | 时间 (sec) | 循环数 |
|--------|--------------------|----------|-----|
| Step 1 | 95 | 30 | 1 |
| Step 2 | 95 | 5 | 40 |
| | 60 | 30 | |
| Step 3 | 溶解曲线 (机器默认程序) | | |

其中上下游引物序列如下表所示：

表 3 PCR 引物序列

| 基因名称 | 引物序列 (5'-3') |
|---------|-----------------------------|
| GAPDH-F | AAGAGCACAAGAGGAAGAGAGAGAGAC |
| GAPDH-R | GTCTACATGGCAACTGTGAGGAG |
| NLRP3-F | GATCTTCGCTGCGATCAACAG |
| NLRP3-R | CGTGCATTATCTGAACCCAC |
| CASP1-F | TGCTCTCCACACCAGATA |

| | |
|---------|-------------------------|
| CASP1-R | TCACAGGAACAGGCATATTC |
| CASP3-F | AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC |
| CASP3-R | ACAGTCCAGTTCTGTACCACG |
| CASP4-F | CAGAAGGCAACCACAGAA |
| CASP4-R | TGTTCCACCAAGTTATCCAA |
| GSDMD-F | GTGTGTCAACCTGTCTATCAAGG |
| GSDMD-R | CATGGCATCGTAGAAGTGGAAG |
| GSDME-F | CCCAGGATGGACCATTAAGTGT |
| GSDME-R | GGTTCCAGGACCATGAGTAGTT |
| IL1B-F | ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA |
| IL1B-R | GTCGGAGATTCGTAGCTGGA |
| IL18-F | GGACAGTCAGCAAGGAAT |
| IL18-R | TCTGGAAGGTCTGAGGTT |

(4) 数据分析：每个样本设置 3 个重复孔以减少实验误差。内参为 GAPDH，检测样本中要检测的目的基因和对应内参的 Ct 值。采用相对定量的方法计算各样本中 ΔCt 值 ($\Delta Ct = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参基因 Ct 值}$)，再计算 $\Delta\Delta Ct$ 值 ($\Delta\Delta Ct = \text{目的基因 } \Delta Ct \text{ 值} - \text{内参基因 } \Delta Ct \text{ 值}$)，最终目的基因表达量用相对于内参的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示，该数值代表实验组相对于对照组两组间目的基因表达的差异倍数。

2.2.6 蛋白提取及测蛋白浓度

(1) 蛋白提取：从培养箱取出处理后的细胞，倒掉培养基，用预冷的 PBS 洗 2 次；加入预混好的 RIPA 裂解混合液 (RIPA:PMSF=100:1)，冰上裂解 10 分钟；在冰上用细胞刮将细胞刮于一处，置于冰上充分裂解 2 分钟；将混合液移入 EP 管，4℃离心，15000rpm，15 分钟；小心将上清液 (蛋白组分) 移入新的 EP 管中，即完成蛋白提取，提取后的蛋白置于 -80℃ 冰箱保存。

(2) BCA 法测蛋白浓度：制备蛋白标准品，用 RIPA 裂解液将标准品稀释到终浓度为 0.5mg/ml 备用；按所需体积制备 BCA 工作液，按 200 μ l 每孔配制，体积比 A 液:B 液=50:1，充分混匀；分别在 96 孔板其中 8 个孔中，加入蛋白标准品 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l，然后补入 RIPA 使每孔液体总体积统一为 20 μ l，则最终标准品浓度分别为 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/ml；各组取 2 μ l 蛋白样品加入 96 孔板中，再加 18 μ l 的 RIPA 补齐体积至 20 μ l；加样结束后，分别于每孔

加入 200 μ l 配好的 BCA 工作液；37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟；孵育结束后，应用酶标仪检测 562nm 波长的吸光度；根据标准曲线计算蛋白浓度。

2.2.7 Western Blot

(1) 实验前准备：将电泳槽、玻璃板、梳子分别清洗干净。

(2) 制胶：将洗净的玻璃板对齐，夹于制胶架上，向玻璃板缝隙中加入蒸馏水，用以检查玻璃板密闭性；配制分离胶，浓度依据所要检测蛋白的分子量决定，体积依据所要配制的胶数目决定，配制时，注意要最后加入 TEMED，起到最终凝固作用；确认好玻璃板密闭性良好后，将水倒掉，然后用滤纸吸干水分；将分离胶中在离心管内充分混匀后迅速倒入玻璃板内灌胶，然后在分离胶上方加入无水乙醇进行液封，等待其凝固；配制浓缩胶；待分离胶凝固完全后，将其上方的无水乙醇倒掉，小心倒入浓缩胶，缓慢插入梳子，全程避免产生气泡。

(3) 配制蛋白样本：蛋白样品、RIPA、上样缓冲液 (loading buffer)，三者遵循最终蛋白样本等质量等体积的原则，按照之前 BCA 测蛋白浓度结果计算好各组分体积后混合，进行离心，煮样条件：100 $^{\circ}$ C，5 分钟，然后取出放于冰上。

(4) 配制电泳液：Tris-Base 3.03g+甘氨酸 14.4g+SDS 1.0g，加蒸馏水定容至 1L，摇匀。

(5) 待浓缩胶凝固后，从制胶架上取下玻璃板夹入电泳槽中，在玻璃板中间区域倒满电泳液，使其没过短板，电泳槽内也倒入电泳液防止内部电泳液渗漏，垂直缓慢地拔出梳子。

(6) 将煮好的样本震荡离心后用移液器进行上样，完成样品上样后，在两侧泳道对称位置各加 5 μ l marker。

(7) 电泳：第一阶段为 80V，待样品由浓缩胶电泳到分离胶后 (大约 30 分钟)，将电压改为第二阶段 120V，直至跑完全程。

(8) 配制转膜液：Tris-Base 3.03g+甘氨酸 14.4g+甲醇 200ml，加蒸馏水定容至 1L，混匀。

(9) 电泳结束后，将转膜夹、滤纸、海绵泡在转膜液里，取出玻璃板，小心冲洗后置于转膜液中，在转膜液中小心起开玻璃板后，将胶转移至滤纸上；根据胶的大小剪裁 PVDF 膜，做好标记以区分蛋白上样顺序，于甲醇中浸泡 30 秒用以激活 PVDF 膜，再将膜移至转膜液中；按由下至上，转膜夹黑色面-海绵-滤纸-胶-PVDF 膜-滤纸-海绵-转膜夹白色面的顺序制成三明治转膜组，全程注意不要有气泡产生。

(10) 将转膜槽放于冰上进行冰浴转膜，将三明治转膜组放入转膜槽，遵循原

则为黑对黑，白对红，按照颜色对准电极，在转膜槽中倒满转膜液并加入冰盒用以在转膜过程中进行降温，200mA 恒定电流进行转膜，转膜时间依据蛋白分子量大小决定。

(11) 配封闭液：脱脂奶粉 2.5g 加入 1×TBST 定容至 50ml，震荡摇匀。

(12) 转膜结束后，将膜取出，用刚配制好的封闭液室温封闭 2 小时，此过程在水平摇床上进行。

(13) 用一抗二抗稀释液配制一抗，一抗稀释比参见抗体说明书。

(14) 封闭结束后，倒掉封闭液，1×TBST 洗膜 1 次。

(15) 倒入配制好的一抗孵育，4℃过夜，此过程在水平摇床上进行。

(16) 第二天，回收一抗，置于-40℃冰箱内保存。

(17) 1×TBST 进行洗膜 3 次，每次 10 分钟。

(18) 用一抗二抗稀释液配制二抗，二抗稀释比参见抗体说明书。

(19) 二抗室温孵育 1-2 小时，此过程在水平摇床上进行。

(20) 回收二抗，置于-40℃冰箱内保存。

(21) 1×TBST 进行洗膜 3 次，每次 10 分钟。

(22) 按所需体积配制发光液，体积比为 A 液:B 液=1:1。

(23) 显影仪下发光显影，进行蛋白定量分析。

2.2.8 质粒扩增

(1) 配制 LB 培养基：按比例将双蒸水加入 LB 培养基干粉中，溶解成溶液并高压消毒。固体培养基未凝固前按 1:1000 的比例加入氨苄青霉素钠，混合均匀后倒入平皿中，待培养皿中固体培养基凝固后，将平皿倒置放置于 4℃冰箱备用。液体培养基高压后也放置于 4℃冰箱备用。

(2) 重组载体质粒转化细菌：每组取 100μl 感受态细胞，冰浴解冻，每管加 50ng 的质粒，轻弹 EP 管混匀内容物，在冰上静置 20 分钟；20 分钟后，将 EP 管插在浮板中，将浮板置于 42℃水浴锅中，热激 90 秒，迅速插回冰中，使细菌冷却 10 分钟。

(3) 筛选转化成功细菌：每管加入 500μl 无抗生素液体 LB 培养基，在 37℃水浴锅中缓慢摇晃（80rpm）1 小时，目的是复苏细菌并且使其表达抗性基因；将 50μl 已转化的感受态菌液涂布到已恢复到室温的含氨苄霉素的 LB 固体培养基上，稍待半分钟，待培养基表面干燥倒置平皿，于 37℃培养过夜。

(4) 转化细菌扩增：拿出平皿，挑取 1 个前一天培养的单菌落的转化细菌，放

于 5ml 含氨苄霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 220rpm 摇菌 12 小时; 12 小时后, 待离心管内菌液浑浊, 将离心管内 5ml 的浑浊菌液加到 100ml 含氨苄霉素 LB 液体培养基中, 37℃ 220rpm 摇菌过夜。

(5) 质粒提取及纯化: 按照质粒提取试剂盒步骤, 将过夜培养的浑浊菌液加入离心管内, 室温 8000rpm 离心 3 分钟, 倒掉上清, 收集细菌沉淀; 尽量吸除干净上清, 用吸水纸吸去管壁水滴; 向含菌体沉淀的离心管内加入 8ml 溶液 P1, 使用吸管反复吹打, 充分悬浮细菌沉淀; 向离心管中加入 8ml 溶液 P2, 然后立即轻柔地上下翻转 8 次, 使菌体充分裂解, 放置 5 分钟; 向离心管中加入 8ml 溶液 P4, 然后立即轻柔地上下翻转 8 次, 充分混匀至溶液出现白色分散絮状沉淀; 在室温放置 10 分钟后, 8000rpm 离心 20 分钟, 使白色沉淀离心至管底, 在此期间将吸附柱 CP6 放在 50ml 收集管上, 在吸附柱中加入 2.5ml 的平衡液 BL, 8000rpm 离心 2 分钟, 倒去收集管内液体, 将吸附柱重新放回收集管内; 菌液离心结束后, 将上清中全部溶液倒入过滤器 CS1 中, 缓慢推动推柄进行过滤, 将滤液收集在干净的 50ml 离心管中; 向滤液中加入 0.3 倍体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 转移到吸附柱 CP6 中, 8000rpm 离心 2 分钟, 倒去收集管内废液, 将吸附柱重新放回收集管, 因吸附柱体积容量有限, 滤液需分两次离心; 向吸附柱中加入 10ml 漂洗液 PW, 室温 8000rpm 离心 2 分钟, 倒去收集管内废液, 将吸附柱重新放回收集管, 再次加入 10ml 漂洗液 PW, 室温 8000rpm 离心 2 分钟, 倒去收集管内废液, 将吸附柱重新放回收集管; 向吸附柱中加入 3ml 无水乙醇, 室温 8000rpm 离心 2 分钟, 倒去废液; 将吸附柱重新放回收集管, 室温 8000rpm 离心 5 分钟; 将吸附柱 CP6 放在一个新的 50ml 收集管内, 用移液器向吸附膜中央位置滴加 1ml 洗脱液 TB, 放置 5 分钟, 室温 8000rpm 离心 2 分钟, 离心后收集管内洗脱液即为提取出的质粒, 将这些洗脱液全部移入干净的 1.5ml EP 管内, 将 EP 管置于 -20℃ 冰箱内保存。

(6) 质粒浓度及纯度测定: 应用紫外分光光度计测定 DNA 浓度为质粒浓度, OD260/OD280 为质粒纯度。

2.2.9 细胞质粒转染

- (1) 细胞消化后进行细胞计数, 细胞计数步骤同前。
- (2) 按照每培养皿接种细胞数 5×10^5 个将细胞接种于 60mm 培养皿中, 置于 5% CO₂, 37℃ 培养箱中培养。
- (3) 待细胞贴壁且密度为 40-60% 时对细胞进行质粒转染。
- (4) 配制混合液:

转染试剂混合液 A: 生理盐水 200 μ l+ transfection 6 μ l

质粒混合液 B: 生理盐水 200 μ l+ shCASP3 质粒 5 μ g

质粒混合液 C: 生理盐水 200 μ l+对照质粒 5 μ g

合并 A+B/A+C 两溶液并混匀。

(5) 转染: 提前将培养皿中原细胞培养液吸出, 每孔加入 2ml 新细胞培养基, 将上述复合物直接加入到细胞培养基中, 轻摇细胞培养皿, 细胞置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中继续培养 12 小时。

(6) 细胞换液: 吸出含转染试剂的原培养基, 换 4ml 新完全培养基继续培养, 72 小时后使用转染后细胞进行后续实验。

2.2.10 JC-1 检测 UVA 处理及照光后加 NAC 处理对线粒体膜电位的影响

(1) 细胞计数。

(2) 细胞铺板: 将处于对数生长期的成纤维细胞接种于 12 孔板中, 每孔细胞量约为 1×10^5 个, 每孔 DMEM 培养液体积为 1ml, 于 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养。

(3) 细胞照光及加药: 在显微镜下观察到铺板后的细胞密度达到 80-90%时, 对细胞进行梯度 UVA 照射, 剂量分别为 0、10、20、30J/cm², 照射后将细胞放回培养箱中继续培养。NAC 处理组细胞和对照组及单独照光组照光处理时, UVA 剂量为 30J/cm²。加药处理组细胞在照光后即刻加入 5mM NAC, 与其他组细胞继续置于培养箱培养 24 小时后进行荧光染料染色。

(4) 配制 JC-1 染色工作液: 吸取试剂盒内 JC-1(200X)组分, 按照每 10 μ l JC-1(200X)加入 1.6ml 超纯水的比例稀释 JC-1。剧烈涡旋充分溶解并混匀 JC-1。然后再加入 400 μ l JC-1 染色缓冲液(5X)组分, 混匀后即为 JC-1 染色工作液。

(5) 荧光染色: 吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 每孔加入 0.5ml 完全培养基, 加入 0.5ml 的 JC-1 染色工作液, 充分混匀。细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。

(6) 配制 JC-1 染色缓冲液: 按照每 1ml JC-1 染色缓冲液(5 \times)组分加入 4ml 蒸馏水的比例, 配制成适量的一倍浓度的 JC-1 染色缓冲液, 并放置于冰浴。

(7) 洗涤: 37 $^{\circ}$ C 孵育结束后, 吸除 JC-1 工作液与细胞培养基的混合物, 用稀释后的 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。洗涤后, 每孔加入 1ml 的完全培养基。

(8) 镜下观察: 孵育结束后, 在荧光显微镜下观察荧光效果并拍照。

2.3 统计学分析

同第一部分。

3 结果

3.1 UVA 照射成纤维细胞后焦亡通路转录水平的改变

为了初步探索 UVA 照射后参与诱导成纤维细胞焦亡的分子，我们使用处于对数生长期的 HSF 细胞进行不同剂量的 UVA 照光处理，在 24 小时后提取细胞 RNA，使用 RT-qPCR 检测各参与细胞焦亡分子的转录水平表达变化。如图 2.1 所示，RT-qPCR 结果显示，参与经典炎症小体焦亡途径的 NLRP3、CASP1、IL-18 在细胞照光后未出现显著变化。而 GSDMD 虽然与对照组产生统计学差异，但其差异倍数偏低且未见明显的剂量依赖性，与我们第一部分研究结果不符。CASP3、CASP4、GSDME、IL-1B 在照光后有剂量依赖性升高趋势，且都在 UVA=30J/cm² 的剂量与对照组有显著差异。这个结果与我们第一部分研究结果一致，即在高剂量 UVA 处理后，成纤维细胞表现出明显的细胞焦亡，因此，我们将 UVA=30J/cm² 的剂量作为后续细胞焦亡研究的剂量。

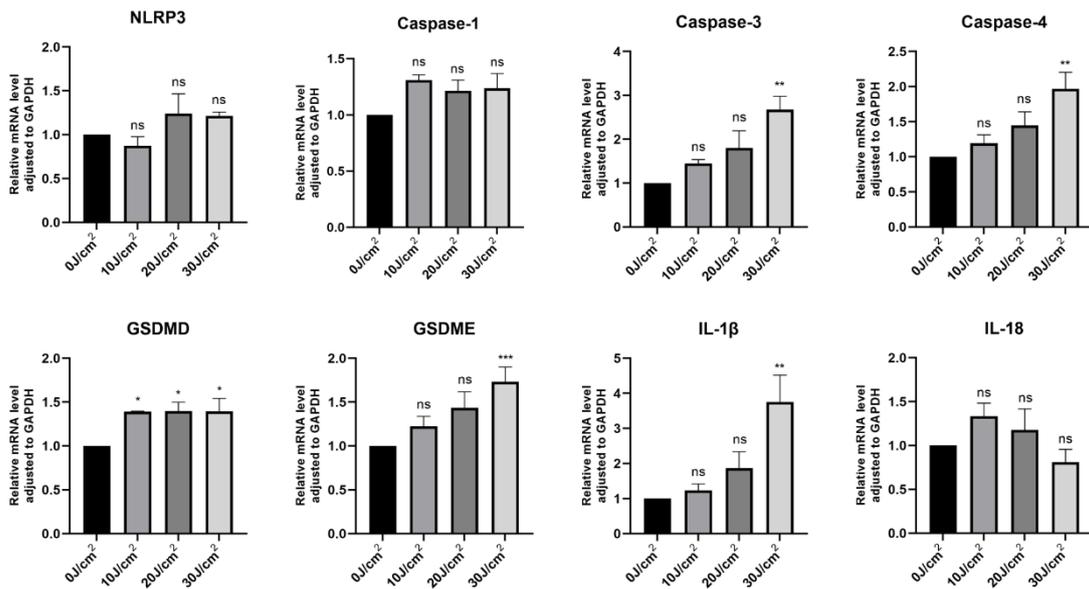


图 2.1 成纤维细胞照光后焦亡相关分子表达变化情况

RT-qPCR 结果显示部分焦亡相关分子在不同剂量 UVA 照射后，CASP3、CASP4、GSDME、IL-1B 在 30J/cm² 的剂量照光后与对照组有显著差异。结果表示为均数±标准误。P 值小于 0.05 具有统计学意义，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ 。

3.2 UVA 照射成纤维细胞后焦亡通路蛋白水平的改变

根据第一部分及焦亡相关分子转录水平表达结果,我们选择 $UVA=30J/cm^2$ 的剂量作为后续细胞焦亡研究的剂量。因此为了探索焦亡分子的蛋白表达变化和选择变化差异最明显的时间点以作为后续实验依据,我们选择在该剂量下不同时间点(6小时、12小时、18小时和24小时)提取 HSF 细胞蛋白,分别检测在照射 $30J/cm^2$ 的 UVA 后,细胞内 GSDMD 依赖途径的相关分子(NLRP3、caspase-1、caspase-4 和 GSDMD-N)和 GSDME 依赖途径的相关分子(caspase-3 和 GSDME)的蛋白表达变化。如图 2.2 所示,caspase-3 和 GSDME 在照光后激活为活性形式 cleave caspase-3 及 GSDME-N 端,其剪切形式均于照光后 12h 出现激活高峰,随后逐渐下降。而 NLRP3、caspase-1、caspase-4 和 GSDMD-N 在照光后 24h 内,蛋白水平下未见明显表达变化和激活变化。因此,在 UVA 照光后观测到成纤维细胞焦亡现象的发生,可能是激活了 GSDME 相关的焦亡通路,而不是激活了 NLRP3 炎症小体通路或其他与 GSDMD 激活有关的焦亡通路。

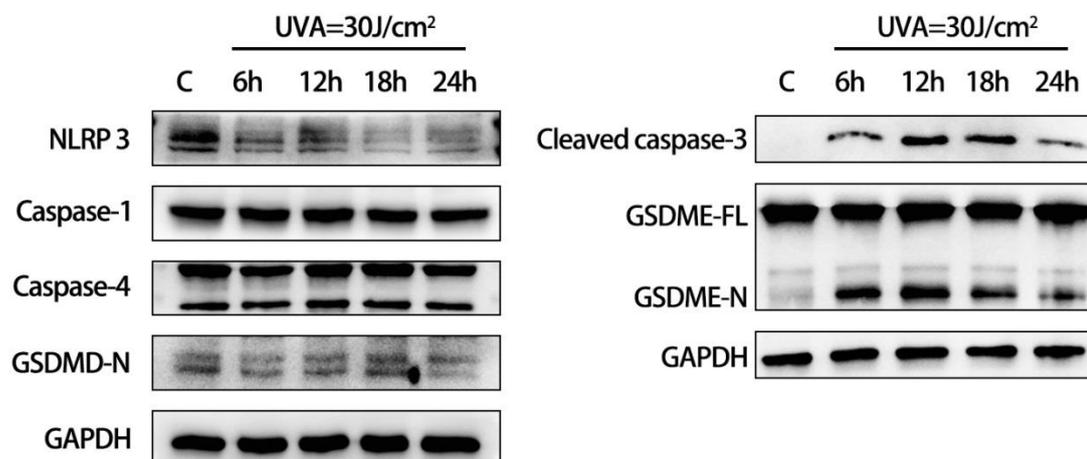


图 2.2 UVA 处理后不同时间点焦亡相关分子的蛋白表达变化

Western Blot 结果显示,在照光后 caspase-3、GSDME 发生剪切激活,形成 cleaved caspase-3 和 GSDME-N 端,GSDMD 相关焦亡通路分子未发生明显变化。

3.3 不同剂量 UVA 对成纤维细胞 caspase-3 和 GSDME 激活的影响

第一部分实验中,我们已经发现成纤维细胞在经过 UVA 处理后,显示出剂量依赖性的细胞焦亡表现,包括细胞形态学改变及细胞损伤情况变化。在对部分焦亡相关分子进行转录水平变化和蛋白水平变化的检测后,综合两者实验结果,我们推

测在 UVA 诱导皮肤成纤维细胞发生细胞焦亡中，起主要作用的是 GSDME 相关的焦亡通路。因此，为了进一步探究 GSDME 相关的焦亡通路在 UVA 诱导成纤维细胞焦亡中的改变，我们使用不同剂量的 UVA 对两种成纤维细胞进行处理，在照光后 12 小时时间点提取细胞蛋白，对 PARP、cleaved caspase-3、GSDME 等分子进行 Western Blot 检测。如图 2.3 所示，无论是 HSF 细胞还是 HDF 细胞，两种细胞都在 UVA 处理后出现了 caspase-3 及其下游 PARP 的剪切、GSDME 发生剪切出现 GSDME-N 端。与我们预期结果相一致，GSDME 相关的焦亡通路分子的激活同样显示出剂量依赖性，且其出现激活的剂量也与我们在第一部分观测到细胞焦亡表现的初始剂量相一致，即在 UVA 为 $20\text{J}/\text{cm}^2$ 的剂量时，开始观察到 caspase-3、GSDME 的激活，而当 UVA 剂量升高至 $30\text{J}/\text{cm}^2$ 的剂量时，其焦亡通路的激活更加明显。与第一部分实验结果相一致的是，在蛋白水平，我们同样发现在照光后，HSF 细胞(A)相较于 HDF 细胞(B)更易发生细胞焦亡的激活。

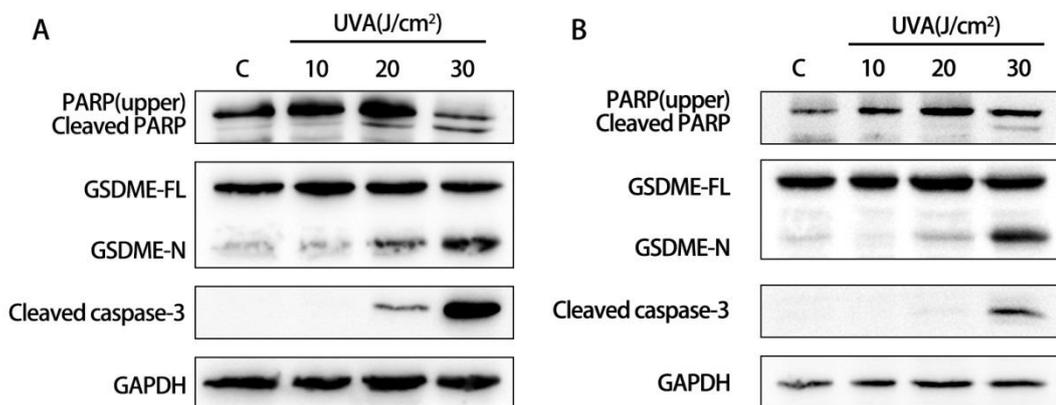


图 2.3 不同剂量 UVA 处理 GSDME 相关焦亡通路分子蛋白水平变化

A 图为 HSF 细胞结果，B 图为 HDF 细胞结果。Western Blot 结果显示，GSDME 相关焦亡通路分子随 UVA 剂量升高而激活增加。

3.4 UVA 激活成纤维细胞 caspase-3/GSDME 通路的验证

在其他研究中已经发现 caspase-3 可以作为上游分子，在其形成 cleaved caspase-3 形式后对 GSDME 进行剪切激活。为了再次验证在 UVA 处理皮肤成纤维细胞后出现 caspase-3/GSDME 通路激活，我们利用质粒对原代成纤维细胞(HDFs)对 caspase-3 进行敲低。经过转录水平验证后，对敲低细胞进行照光处理，并通过 western blot 在蛋白水平对 caspase-3 在照光后的激活及其激活状态对 GSDME 的剪切作用进行

了验证。如图 2.4 所示，转录水平下，*CASP3* 基因表达较对照质粒组表达降低 50% 左右。Western blot 结果显示，在成纤维细胞照光后，caspase-3 敲低组所表达的激活态 cleaved caspase-3 明显降低，与未照光组无统计学差异，同时，GSDME-N 端的表达与 cleaved caspase-3 相一致，即照光后 caspase-3 敲低组细胞表达的 GSDME-N 端降低，而 GSDME 全长未剪切体未受 caspase-3 敲低影响，表达未发生变化。说明成纤维细胞经紫外线 UVA 照射后，GSDME 的剪切由 caspase-3 的激活所介导，当 caspase-3 表达下降时，其剪切激活也受到抑制。

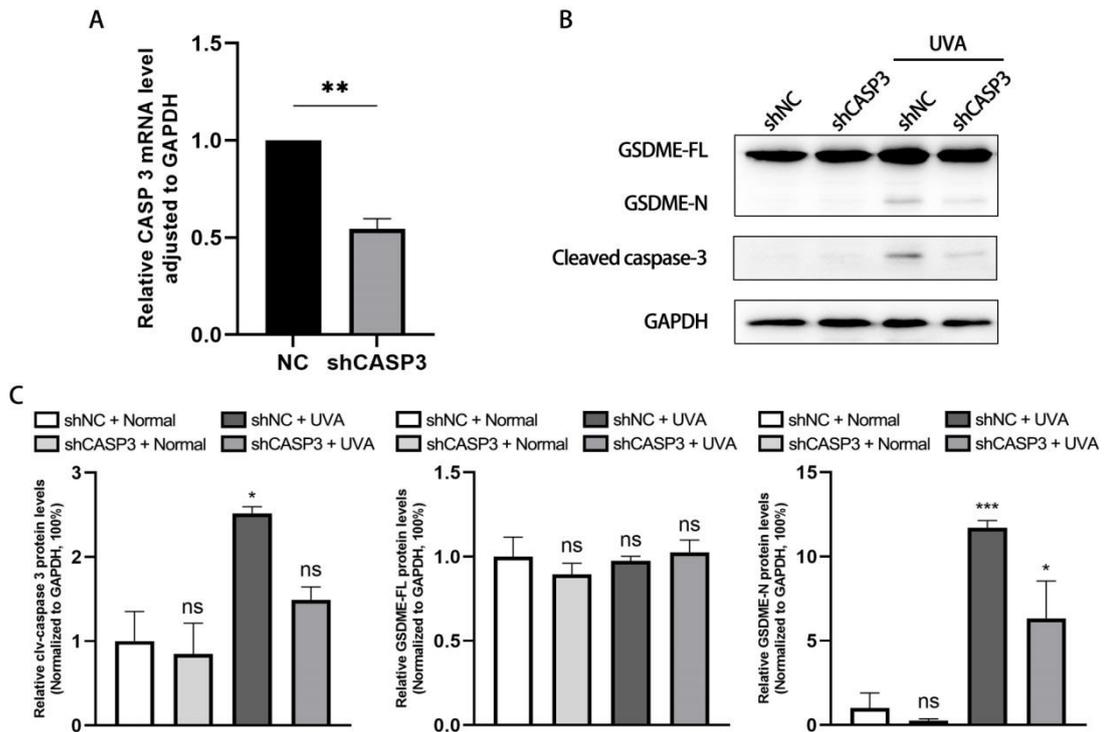


图 2.4 抑制 caspase-3 的表达可以抑制 UVA 诱导的 GSMDE 剪切

A. *CASP3* 敲低质粒对 mRNA 的减低效果验证。B. 用 *CASP3* 敲低质粒或对照质粒对 HDF 细胞敲低后照光处理，其对 cleaved caspase-3、GSDME-FL、GSDME-N 的表达影响。C. cleaved caspase-3、GSDME-FL、GSDME-N 蛋白表达水平变化的定量（经内参 GAPDH 校正），Image J 进行灰度值测量。结果表示为均数±标准误。*P* 值小于 0.05 具有统计学意义，*表示 *P*<0.05，**表示 *P*<0.01，***表示 *P*<0.001。

3.5 氧化应激参与 UVA 诱导成纤维细胞 caspase-3/GSDME 细胞焦亡通路的激活

在前面实验中,我们已经明确 UVA 诱导成纤维细胞焦亡是通过激活了 caspase-3/GSDME 通路,为了进一步探究氧化应激是否参与其中,在成纤维细胞照光处理后,向加药组细胞中加入 5mM 的 NAC 药物,提取细胞蛋白组分,通过 western blot 检测 caspase-3/GSDME 焦亡通路分子。如图 2.5 所示,HSF 细胞和 HDF 细胞在照光后, caspase-3、GSDME、PARP 都出现了剪切激活,加入抗氧化剂 NAC 后,其剪切体均受到抑制表达降低。表明抑制氧化应激后, caspase-3/GSDME 焦亡通路的激活受到抑制,说明氧化应激参与 UVA 诱导成纤维细胞 caspase-3/GSDME 细胞焦亡通路的激活。

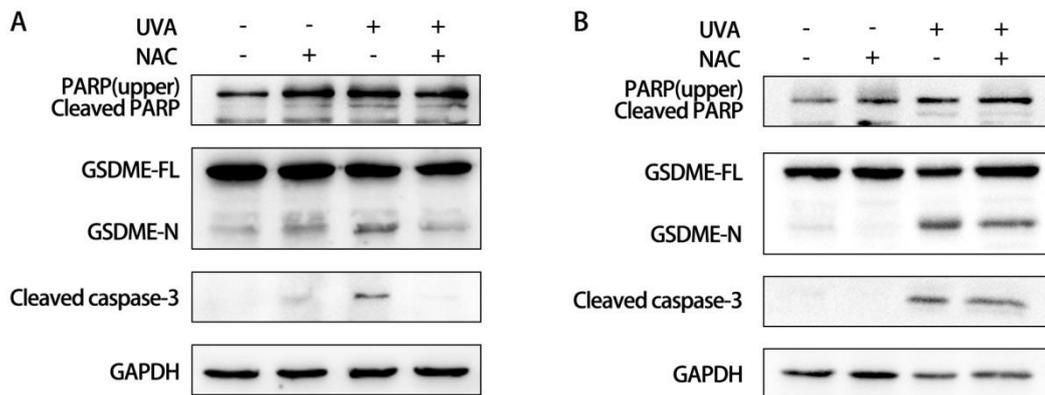


图 2.5 氧化应激参与 caspase-3/GSDME 细胞焦亡通路激活

HSF 细胞 (A) 和 HDF 细胞 (B) 照光后发生 caspase-3、GSDME、PARP 的剪切,在加入 NAC 抗氧化处理后, caspase-3、GSDME、PARP 三种分子的剪切受到抑制。

3.6 UVA 激活皮肤成纤维细胞线粒体途径凋亡

我们已经发现 UVA 照光处理后,成纤维细胞出现 caspase-3 的剪切,其作为凋亡效应分子,我们为了探究在 UVA 照光后成纤维细胞凋亡与细胞焦亡的关系,对线粒体途径的凋亡进行了检测。JC-1 是一种用于检测线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的荧光探针。在线粒体膜电位较高时, JC-1 形成聚合物,可以发出红色荧光,在线粒体膜电位较低时, JC-1 为单体,可以发出绿色荧光。通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可以反应出细胞线粒体膜电位的下降。通过 JC-1 检测在不同 UVA 剂量下线粒体膜电位变化,并在不同时间点检测线粒体途径凋亡相关分子和细胞焦亡效应分子

的变化,以明确是否发生线粒体途径凋亡及其与细胞焦亡发生的先后关系。JC-1 检测线粒体膜电位结果如图 2.6 所示,随着 UVA 剂量增大,绿色荧光比例增多,说明线粒体膜电位呈剂量依赖性下降。western blot 结果(图 2.7)显示,cleaved caspase-9 随 UVA 剂量升高同样呈剂量依赖性变化,说明 UVA 激活成纤维细胞线粒体途径凋亡过程呈剂量依赖性增加。同时在 $30\text{J}/\text{cm}^2$ 的剂量下线粒体膜电位显著下降,cleaved caspase-9 表达明显,提示在此剂量下有线粒体途径凋亡发生。Western blot 结果显示,在 $\text{UVA}=30\text{J}/\text{cm}^2$ 的剂量下,成纤维细胞 2h 内即出现 cleaved caspase-9、Bax、Cyto c 等线粒体途径凋亡分子的升高,而 GSDME 在 2h 处开始出现剪切激活,而在之后逐渐升高,说明线粒体途径凋亡激活的发生早于细胞焦亡途径的激活。

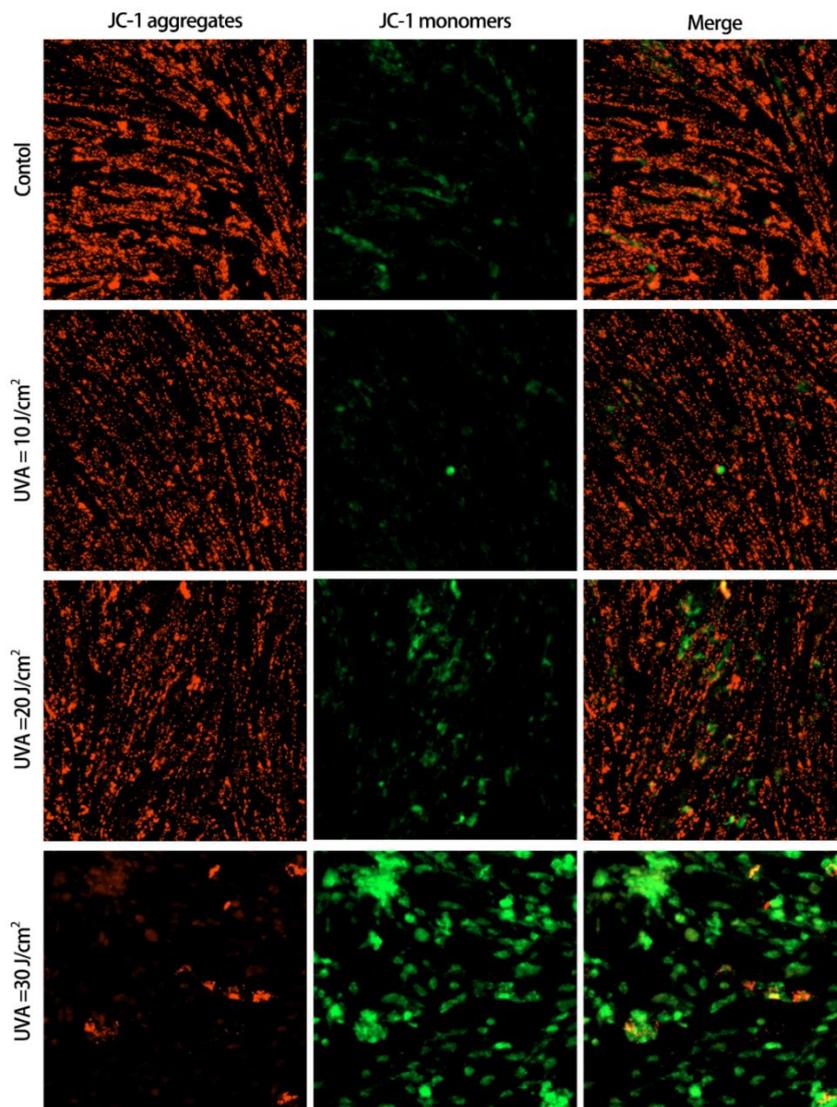


图 2.6 UVA 照光对成纤维细胞线粒体膜电位的影响

JC-1 检测线粒体膜电位。UVA 照光后, HDF 细胞线粒体膜电位随着 UVA 呈剂量依赖性下

降。

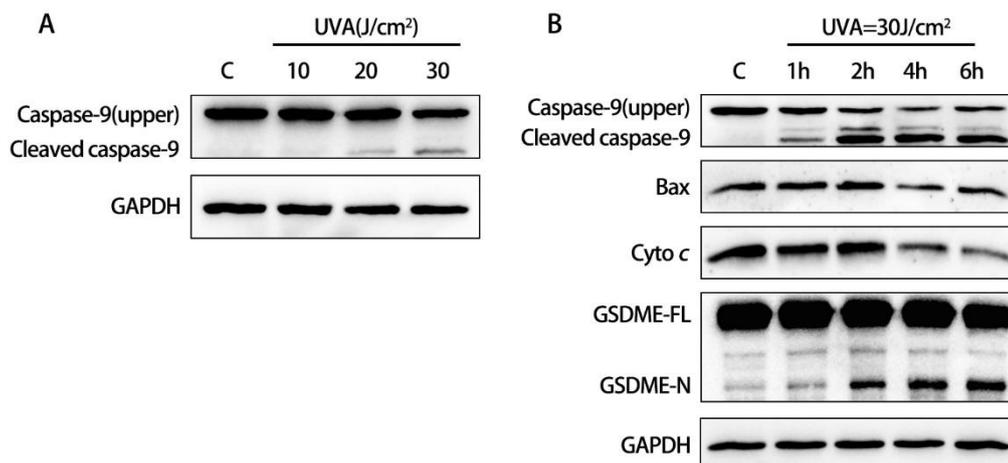


图 2.7 UVA 照光对成纤维细胞线粒体途径凋亡分子表达的影响

A. Western blot 检测线粒体途径凋亡分子 caspase-9, cleaved caspase-9 随 UVA 强度增大呈剂量依赖性表达增多。B. Western blot 检测线粒体途径凋亡分子和 GSDME, 线粒体途径凋亡分子的激活早于细胞焦亡分子的激活。

3.7 氧化应激参与 UVA 诱导的线粒体途径凋亡

前期研究中, 我们已经明确 UVA 通过引起皮肤成纤维细胞内氧化应激的发生对细胞造成光损伤。因此, 为了明确 UVA 是否通过引起细胞内氧化应激去诱导线粒体途径凋亡的激活, 我们加入抗氧化剂 NAC 来对细胞内氧化应激产生抑制作用。

在成纤维细胞照光处理后, 向加药组细胞中加入 5mM 的 NAC 药物。分别于细胞照光处理 24 小时后进行 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位变化和在细胞照光处理 2 小时后提取细胞蛋白进行 western blot 实验检测线粒体途径凋亡分子变化。如图 2.8 所示, HDF 细胞照光后, 线粒体膜电位明显下降, 使用 NAC 抑制细胞内氧化应激后, 线粒体膜电位下降受到抑制。Western blot 结果 (图 2.9) 同样提示, 在使用 NAC 抑制氧化应激后, 原本照光后表达升高的线粒体途径凋亡分子 (cleaved caspase-9、Bax、Cyto c) 出现下降。线粒体途径凋亡随着细胞内氧化应激的减少而受到抑制, 说明 UVA 通过诱导成纤维细胞内氧化应激来激活线粒体途径凋亡。

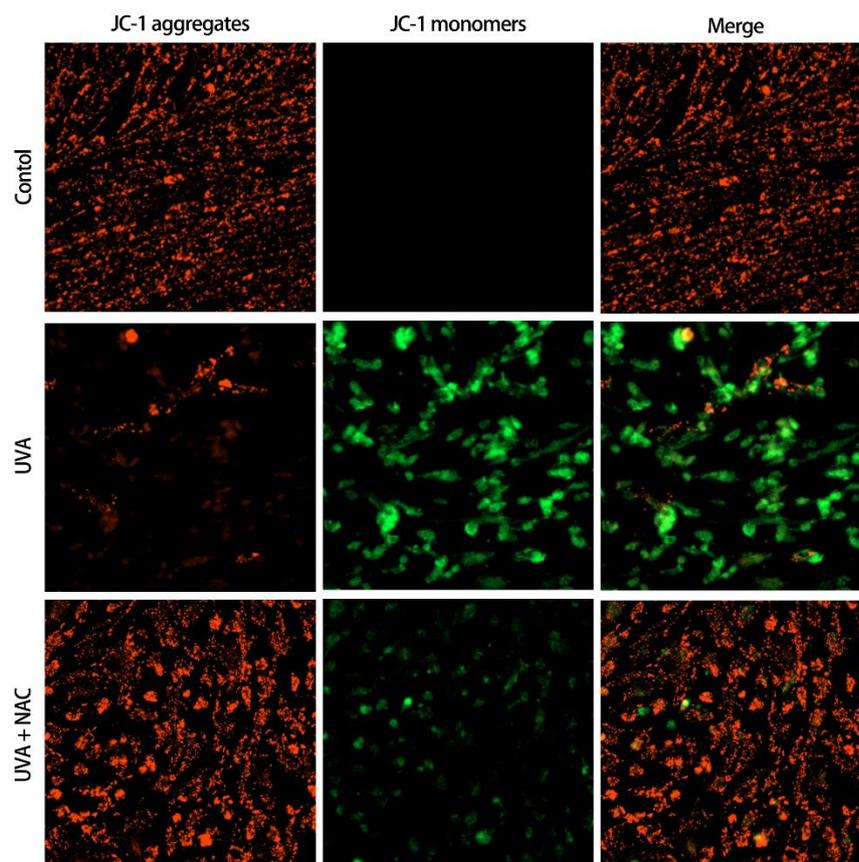


图 2.8 NAC 处理抑制 UVA 引起的线粒体膜电位下降

HDF 细胞在 UVA 照光处理后，绿色荧光比例明显增多，线粒体膜电位下降，经 NAC 抗氧化剂加药处理后，其绿色荧光比例明显下降，线粒体膜电位升高。

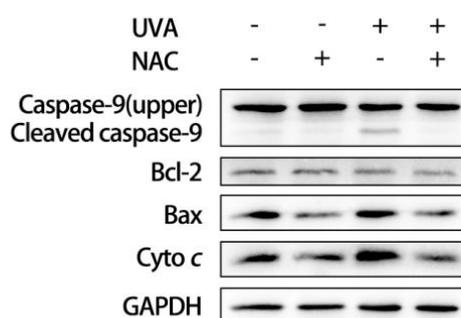


图 2.9 氧化应激参与 UVA 诱导的线粒体途径凋亡

HDF 细胞在 UVA 照光处理后，线粒体途径凋亡分子表达升高，经 NAC 抗氧化剂加药处理后，其表达较照光组下降。

4 讨论

在此部分研究中,我们分别在成纤维细胞照光后对 GSDMD 依赖的焦亡通路和 GSDME 依赖的焦亡通路进行了检测,确定了 UVA 主要通过激活 caspase-3/GSDME 通路使成纤维细胞发生细胞焦亡,并通过对 caspase-3 的敲低,进一步验证了这一通路在 UVA 照射成纤维细胞中的激活。

在 UVB 照射人表皮角质形成细胞的研究中,有研究发现经过 UVB 照射角质形成细胞可以活化炎症小体进而通过激活 caspase-1,剪切并释放炎症因子。这可能是由于人体皮肤的角质形成细胞作为皮肤最外层的保护屏障,发挥着免疫功能, caspase-1 可以剪切 IL-1 β 和 IL-18,这些炎症因子可以募集中性粒细胞对受到 UVB 辐射的皮肤起到一定的保护作用^[47,48]。有文献报道 UVB 虽然活化了炎症小体和 caspase-1 及释放了 IL-1 β ,但只检测到十分微弱或未检测到角质形成细胞内 GSDMD 的激活,甚至 GSDMD 在照光后凋亡的角质形成细胞中发生降解,但敲低组细胞所释放的乳酸脱氢酶和 IL-1 β 虽然前期有所降低但在 24 小时之后与野生型相当,这可能是由于发生了其他途径的焦亡所释放的另外他们还发现敲低 GSDMD 的角质形成细胞在照光后 cleaved caspase-3 较野生型表达升高^[49]。之后有研究发现了 UVB 通过激活 caspase-3 凋亡分子剪切 GSDME 使角质形成细胞发生细胞焦亡^[41]。这与我们发现 UVA 并非通过 GSDMD 的激活引起细胞焦亡,而是通过 caspase-3/GSDME 通路引起成纤维细胞焦亡的研究结果类似。但也有研究发现 UVB 可以引起人晶状体上皮细胞发生 GSDMD 依赖的细胞焦亡,因此我们推测可能是由于除免疫细胞外的皮肤组织细胞所发生的 GSDME 焦亡通路对 GSDMD 依赖的焦亡产生了拮抗作用,使得 GSDME 所引起的焦亡占据主导地位。另外,与 UVB 激活角质形成细胞 caspase-1 不同的是,我们并未发现 UVA 对成纤维细胞炎症小体及 caspase-1 的激活,结合在检测 NLRP3 的 mRNA 水平中,我们发现 NLRP3 在成纤维细胞中表达量过低,所以我们推测可能是由于炎症小体在成纤维细胞中的表达量很少,所以未引起明显 caspase-1 的激活。除 caspase-3 和 GSDME 外,我们在转录水平检测到 UVA 在 30J/cm² 时 caspase-4、GSDMD 和 IL-1 β 出现升高。Caspase-4 的升高可能是由于形成了蛋白复合物(Apaf-1/caspase-4 焦亡小体)的组装对 caspase-3 进行剪切,从而诱导 GSDME 焦亡^[50]。GSDMD 的升高可能与 caspase-3 的剪切有关,与 caspase-1 的剪切位点(D275)不同, caspase-3 在(D87)切割 GSDMD,产生 p45 及 p13 片段,但这些片段无焦亡活性^[34,51],有趣的是,我们也在成纤维细胞照光后的蛋白样本中

检测到了 GSDMD 在 p40 左右有一处片段。而 IL-1 β 的升高可能是 UVA 通过 NF- κ B 对炎症因子产生转录水平的升高，但是否发生了剪切激活及后续释放还需要进一步确定。

有文献报道，GSDME 可以抑制 UVB 引起的中性粒细胞过度募集和活化，从而在 UVB 诱导的皮肤炎症中起到负向调控作用^[52]。因此，我们猜想 UVA 引起成纤维细胞发生 GSDME 的激活，是否与 UVB 照射中 GSDME 的作用相类似，属于皮肤的一种自我保护调节，这一猜想还需要未来进行进一步探索。

2017 年 Nature 上发表的一篇文章发现化疗药物可以诱导 caspase-3/GSDME 细胞焦亡^[53]，自此 caspase-3/GSDME 细胞焦亡通路大部分出现在癌症治疗方面的研究中，目前发现这一通路 with 癌症治疗的有效性^[54]、敏感性^[55]以及副作用^[56]有关。因此，在 UVA 照射后成纤维细胞出现 caspase-3/GSDME 的激活，可能为 UVA 未来应用于癌症治疗提供了理论依据。

在第一部分实验中，我们已经明确了 UVA 通过氧化应激诱导成纤维细胞焦亡。在这一部分实验，我们进一步明确了 UVA 通过氧化应激激活 caspase-3/GSDME 焦亡通路诱导成纤维细胞焦亡。在关于 caspase-3/GSDME 的癌症治疗研究中，也有研究发现氧化应激与 caspase-3/GSDME 的密切关系，顺铂通过 STAT3 β 高表达增加细胞内 ROS 含量，继而通过 caspase-3/GSDME 治疗食管鳞癌^[57]。多柔比星通过 ROS/JNK 信号通路诱导 caspase-3/GSDME 依赖的焦亡^[58]。我们的研究同样得出了类似的结果，本部分实验研究结果有力地证明了氧化应激在 UVA 引起成纤维细胞焦亡中的关键作用。

之后，我们依据 caspase-3 的激活首先从线粒体途径凋亡切入，明确了 UVA 可激活成纤维细胞的线粒体途径凋亡，并且发现线粒体途径凋亡的发生早于成纤维细胞焦亡，而且同焦亡类似的是，线粒体途径凋亡也与 UVA 呈剂量依赖性。其他文献也报道过 UVA 引起线粒体途径凋亡的现象，有文献发现 UVA 可以导致成纤维细胞线粒体膜电位降低^[59,60]，也有研究报道 UVA 可使成纤维细胞 BAX 表达升高 Bcl-2 表达降低^[61-63]，这些都提示 UVA 可引起成纤维细胞线粒体途径凋亡的发生。在蛋白水平检测的结果中，我们发现 Bax 及 Cyto c 先表达升高，而后 caspase-9 才出现剪切，而 caspase-9 的剪切升高与 GSDME-N 端表达升高基本同步，我们推测可能是由于线粒体途径凋亡激活更早，而后通过组装凋亡小体产生足量的活性 caspase-9，才激活 caspase-3/GSDME 焦亡通路，提示 UVA 可能主要通过激活线粒体途径凋亡激活 caspase-3。另外，caspase-3 作为凋亡效应分子又通过剪切 GSDME 引起细胞

焦亡，其在细胞死亡方式转变中发挥着关键作用。在二甲双胍治疗癌症中，低浓度二甲双胍长时间处理可诱导癌细胞线粒体途径凋亡，而高浓度二甲双胍在更短时间内诱发癌细胞发生细胞凋亡及细胞焦亡^[64]，这与我们的实验结果相符，高剂量的 UVA 在 2 小时就可引起细胞凋亡和焦亡通路的激活，在镜下相应时间点也观测到了细胞的形态学改变。因此我们认为在以 caspase-3/GSDME 方式发生焦亡的细胞中，刺激因素的不同浓度或剂量可能决定了细胞死亡的类型，如果刺激条件可激活 GSDME，则细胞同时发生凋亡和细胞焦亡，且细胞死亡时间早于未激活 GSDME 的细胞凋亡时间。

GSDME 的 N 端不仅可以靶向细胞膜，还有研究发现它也可靶向线粒体，促进细胞色素 C 释放，增强 caspase-3 活性，后者可以进一步对 GSDME 进行剪切，而且 GSDME 引起胞膜的破裂要晚于线粒体膜通透性改变^[65]。有文献报道，通过基因表达微阵列证明 GSDME 敲除的小鼠抑制凋亡通路的激活^[66]。因此，GSDME 的剪切体通过增加线粒体膜的通透性而放大内源性通路信号，并进而在焦亡过程中建立自我扩增的正反馈环。是否 UVA 激活成纤维细胞线粒体途径凋亡与 caspase-3/GSDME 中存在这种正反馈，还有待我们进一步验证。虽然我们并未在本研究中重点探索 UVA 引起成纤维细胞线粒体途径凋亡对 caspase-3/GSDME 焦亡通路的直接调控，但大量文献已对线粒体途径凋亡激活 caspase-3 进行了证实，因此我们并未对此关系进行深入研究。

线粒体是细胞能量的主要来源，参与代谢过程和呼吸。它们的主要作用是产生三磷酸腺苷(ATP)、控制细胞代谢和调节细胞凋亡，线粒体功能障碍严重可影响组织稳态^[67]。氧化应激可通过线粒体途径诱导内源性细胞凋亡^[68]，而线粒体功能障碍又会进一步产生更多的活性氧^[69]，形成氧化应激与线粒体损伤的环路。因此，UVA 引起线粒体途径的凋亡与氧化应激密不可分，我们通过使用抗氧化剂 NAC 对氧化应激进行干预，发现 UVA 通过氧化应激引起成纤维细胞线粒体途径凋亡的激活，这一结果同其他有关氧化应激与线粒体途径凋亡的研究相吻合。

在本部分研究中，我们首先探索了 UVA 诱导成纤维细胞发生焦亡的具体机制，排除了 GSDMD 相关的细胞焦亡途径，发现其是通过 GSDME 激活发生的焦亡。经由 GSDME，我们又进一步对线粒体途径凋亡进行了研究。通过这一部分实验，我们发现在 UVA 诱导成纤维细胞焦亡的过程中，氧化应激、线粒体途径凋亡及 caspase-3/GSDME 焦亡通路环环相扣，基于此，针对其中环节研制药物，有望为临床预防和治疗 UVA 引起的光损伤提供新方法和手段。

5 结论

(1) UVA 通过氧化应激激活成纤维细胞 caspase-3/GSDME 焦亡通路，未激活 NLRP3 炎症小体 caspase-1/GSDMD 的经典焦亡通路。

(2) UVA 通过氧化应激激活成纤维细胞的线粒体途径凋亡，且线粒体途径凋亡的激活早于细胞焦亡发生的时间。

第三部分：芍药苷通过减轻氧化应激抑制 UVA 诱导的 线粒体途径凋亡及细胞焦亡

1 前言

近几年关于 GSDME 介导的细胞焦亡的研究也涉及到中药的治疗作用。天然黄酮成分可以抑制顺铂诱导的 GSDME 的激活，从而减少顺铂在治疗癌症中的不良反应^[70]。黄蜀葵花通过 ERK1/2/caspase-8/caspase-3/NLRP3/GSDME 保护肾小管上皮细胞免受尿酸引起的细胞焦亡损伤^[71]。清肠温中汤可以通过抑制 GSDME 介导的焦亡起到预防肠道肿瘤的作用^[72]。但这些中药对于 GSDME 介导的焦亡产生抑制作用的研究中，未涉及到氧化应激在其中的关联。

芍药苷，是芍药根、牡丹根及紫牡丹根等中草药的有效活性成分，这些中草药在中国已经有一千多年的应用历史，常被用作类风湿关节炎、皮肤炎症及妇科炎症等疾病的治疗方剂^[73]。当前研究表明芍药苷有抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤、免疫调节等药理作用。关于芍药苷对于细胞焦亡影响的研究，多集中于 GSDMD 依赖通路，发现芍药苷似乎对于细胞焦亡有一定的抑制作用。芍药苷单体衍生物（MDP）通过调节 TLR4/NLRP3/GSDMD 信号通路抑制巨噬细胞焦亡，对非特异性关节炎大鼠具有治疗作用^[74]。MDP 可调节 GRK2/HIF-1 α /NLRP3 轴对经典细胞焦亡通路进行干预，减缓类风湿性关节炎进展^[75]。芍药苷通过抑制 HIF-1 α /miR-210/caspase1/GSDMD 信号通路，改善缺氧诱导的星形胶质细胞焦亡^[76]。芍药苷可通过抑制 NLRP3、CASP-1、CASP-11、IL-1 β 等焦亡相关蛋白的表达来缓解神经炎症，具有抗抑郁作用^[77]。这些芍药苷抑制细胞焦亡的研究中，还未有研究关注到芍药苷的抗氧化作用在其中有无参与。

我们课题组前期就有关注到芍药苷的抗氧化作用。在白癜风疾病模型中，芍药苷可通过激活 JNK/Nrf2/HO-1 信号通路减轻过氧化氢诱导的黑色素细胞中的氧化应激^[78]。而在 UVA 引起皮肤光损伤的研究中，我们已经明确了芍药苷可以通过增加细胞内抗氧化基因 Nrf2、HO-1、NQ-O1 减轻 UVA 对成纤维细胞的氧化应激损伤^[19]。其它文献也有报道芍药苷的抗氧化作用，在急性肝损伤中芍药苷通过 SIRT1/FOXO1a/SOD2 信号传导，可增加超氧化物歧化酶（SOD）的活性，减轻氧化应激^[79]。芍药苷通过 Nrf2/HO-1 信号通路起到神经保护作用^[80]。芍药苷通过触发

CaMKII 介导的 AMPK 激活减少 Nox1/ROS 相关氧化应激、线粒体功能障碍，剂量依赖性地减轻 atRAL 导致的视网膜色素上皮损伤^[81]。

在第二部分研究中，我们已经明确了 UVA 通过氧化应激激活皮肤成纤维细胞线粒体途径凋亡和细胞焦亡，因此，我们提出假设，芍药苷可以通过减轻氧化应激在 UVA 引起的成纤维细胞焦亡中起到保护作用。为了验证这一假设，我们选择合适浓度的芍药苷对成纤维细胞同时进行预处理和照光后处理，并对线粒体途径凋亡及细胞焦亡相关指标进行检测，以探索芍药苷是否能够通过该通路对 UVA 造成的光损伤起到防治作用。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验对象

(1) 永生化人皮肤成纤维细胞 (HSF), 购于赛百慷 (上海) 生物技术股份有限公司。

(2) 人真皮成纤维细胞 (HDF), 提取于人包皮组织, 来自于中国医科大学附属第一医院泌尿外科手术室。

2.1.2 主要试剂

PBS 缓冲液 (美国, Biosharp 公司)

青霉素/链霉素抗生素溶液 (以色列, Biological Industries 公司)

DMEM 高糖培养基 (中国, 道鹏生物科技公司)

胰蛋白酶 (以色列, Biological Industries 公司)

胎牛血清 (中国, 道鹏生物科技公司)

无血清细胞冻存液 (中国, 新赛美生物科技公司)

线粒体膜电位检测试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)

RIPA 裂解液 (中国, 碧云天生物技术公司)

PMSF (中国, 索莱宝公司)

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (中国, 碧云天生物技术公司)

SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (中国, Biosharp 生物公司)

聚丙烯酰胺凝胶上层胶红色染料 (中国, 赛维尔生物公司)

过硫酸铵 APS 粉末 (中国, 碧云天生物技术公司)

TEMED (中国, 碧云天生物技术公司)

无水乙醇 (中国, 麦克林试剂公司)

Tris-Base (中国, 索莱宝公司)

SDS (中国, 索莱宝公司)

甘氨酸 (中国, 索莱宝公司)

甲醇 (中国, 麦克林试剂公司)

SDS-PAGE 上样缓冲液还原型 (中国, 康为世纪生物公司)

预染彩色蛋白 Marker (中国, 铂莱生物公司)

PVDF 膜（美国，Millipore 公司）
10×TBST 缓冲液（中国，索莱宝公司）
脱脂奶粉（中国，索莱宝公司）
WB 专用一抗二抗稀释液（中国，爱必信生物公司）
GAPDH 抗体（中国，Proteintech 公司）
GSDME 抗体（美国，Abcam 公司）
Cleaved Caspase-3 抗体（美国，Cell Signaling Technology 公司）
PARP 抗体（美国，Cell Signaling Technology 公司）
Caspase-9 抗体（美国，Cell Signaling Technology 公司）
Bax 抗体（美国，Cell Signaling Technology 公司）
Cyto c 抗体（美国，Cell Signaling Technology 公司）
Bcl-2 抗体（中国，景杰生物公司）
过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗抗体（中国，Proteintech 公司）
过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗抗体（中国，Proteintech 公司）
超敏 ECL 化学发光试剂盒（中国，碧云天生物技术公司）
芍药苷（美国，MedChemExpress 公司）
MTS 细胞增殖检测试剂盒（美国，Promega 公司）
乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒（中国，碧云天生物技术公司）
YO-PRO-1/PI 细胞凋亡与坏死检测试剂盒（中国，碧云天生物技术公司）

2.1.3 主要仪器

-80℃深低温冰箱（美国，Thermo 公司）
-20℃低温冰箱（德国，西门子公司）
4℃冰箱（美国，Thermo 公司）
微量移液器（美国，Rainin 公司）
恒温水浴箱（美国，Thermo 公司）
恒温二氧化碳细胞培养箱（美国，Thermo 公司）
生物安全操作台（美国，Thermo 公司）
光学显微镜（日本，Olympus 公司）
Sorvall ST 40R 台式冷冻离心机（美国，Thermo 公司）
UV 801KL（德国，Waldmann 公司）
酶标仪（美国，BioTek 公司）

水平摇床（中国，其林贝尔仪器公司）
涡旋振荡器（中国，其林贝尔仪器公司）
去离子水制备系统（美国，Millipore 公司）
台式离心机（美国，Thermo 公司）
ABI 9700 PCR 扩增仪（美国，Applied Biosystems 公司）
蛋白凝胶电泳槽、电泳仪和转膜槽（美国，Bio-Rad 公司）
化学发光图像分析系统（中国，天能公司）
共聚焦显微镜（日本，Olympus 公司）
荧光显微镜（美国，BioTek 公司）

2.2 方法

2.2.1 细胞复苏、换液、传代与冻存

同第一部分

2.2.2 芍药苷药物配置

芍药苷（PF）分子式为 $C_{23}H_{28}O_{11}$ ，分子量 480.46，称量 100mg 芍药苷粉末，加入适量体积的 DMSO 将其定容至 2.08ml，配制浓度为 100mM 的芍药苷溶液，在 -40°C 温度下储存。

2.2.3 MTS 法检测不同浓度芍药苷对细胞活力的影响

（1）细胞计数。

（2）细胞铺板：将计数后的成纤维细胞，接种于 96 孔板，细胞数量为 5000 个细胞每孔，每组设置 3 个副孔，每孔加入 100 μl DMEM 培养基，于 5% CO_2 ， 37°C 培养箱中继续培养。

（3）细胞加药：在显微镜下观察到铺板后的细胞密度达到 80-90%时，对细胞进行加药处理，分为 5 组不同浓度，浓度分别为 0、100、200、400、800 μM ，加药后将细胞放回培养箱中继续培养。

（4）检测 MTS 细胞活力：于培养箱培养 24 小时后检测细胞的增殖活性。分别于每孔加入 10 μl MTS 试剂， 37°C 培养箱中继续培养 3 小时后，酶标仪检测 490nm 处波长的吸光值。

（5）数据统计：默认对照组细胞活力为 100%，其他组的细胞活力为（各组 490nm 处吸光值/对照组 490nm 处吸光值） $\times 100\%$ 。

2.2.4 JC-1 检测芍药苷加药对 UVA 处理细胞的线粒体膜电位影响

(1) 细胞计数。

(2) 细胞铺板：将处于对数生长期的成纤维细胞接种于 12 孔板中，每孔细胞量约为 1×10^5 个，每孔 DMEM 培养液体积为 1ml，于 5% CO₂，37℃ 培养箱中继续培养。

(3) 细胞加药：细胞密度为 80-90% 后，对细胞进行加药处理，加药处理组加入 400μM 芍药苷，未加药组加入相同体积的 DMSO，放回培养箱中继续培养。

(4) 照光处理：加药预处理 3 小时后，对细胞进行 UVA 照射，剂量为 30J/cm²，照射后将细胞放回培养箱中继续培养。加药处理组细胞在照光后即刻再次加入 400μM 芍药苷，与其他组细胞继续置于培养箱培养 24 小时后进行荧光染料染色。

(5) 配制 JC-1 染色工作液：吸取试剂盒内 JC-1(200X) 组分，按照每 10μl JC-1(200X) 加入 1.6ml 超纯水的比例稀释 JC-1。剧烈涡旋充分溶解并混匀 JC-1。然后再加入 400μl JC-1 染色缓冲液(5×) 组分，混匀后即为 JC-1 染色工作液。

(6) 荧光染色：吸除培养液，用 PBS 洗涤细胞 1 次，每孔加入 0.5ml 完全培养基，加入 0.5ml 的 JC-1 染色工作液，充分混匀。细胞培养箱中 37℃ 孵育 20 分钟。

(7) 配制 JC-1 染色缓冲液：按照每 1ml JC-1 染色缓冲液(5×) 组分加入 4ml 蒸馏水的比例，配制成适量的一倍浓度的 JC-1 染色缓冲液，并放置于冰浴。

(8) 洗涤：37℃ 孵育结束后，吸除 JC-1 工作液与细胞培养基的混合物，用稀释后的 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次。洗涤后，每孔加入 1ml 的完全培养基。

(9) 镜下观察：孵育结束后，在荧光显微镜下观察荧光效果并拍照。

2.2.5 Western blot 实验

同第二部分

2.2.6 显微镜下观察芍药苷加药对 UVA 处理细胞的形态学影响

(1) 细胞计数。

(2) 细胞铺板：将处于对数生长期的成纤维细胞接种于 6 孔板，细胞数量为 10 万个细胞每孔，设置 3 个副孔，每孔 DMEM 培养液体积为 2ml，于 5% CO₂，37℃ 培养箱中继续培养。

(3) 细胞加药：细胞密度为 80-90% 后，对细胞进行加药处理，加药处理组加入 400μM 芍药苷，未加药组加入相同体积的 DMSO，放回培养箱中继续培养。

(4)细胞照光:加药预处理 3 小时后,对细胞进行 UVA 照射,剂量为 $30\text{J}/\text{cm}^2$,照射后将细胞放回培养箱中继续培养。加药处理组细胞在照光后即刻再次加入 $400\mu\text{M}$ 芍药苷,与其他组细胞继续置于培养箱培养

(5)镜下观察:照光 6 小时后,拿出细胞培养板,置于显微镜下观察细胞形态变化,并且留取照片。

2.2.7 检测芍药苷加药对 UVA 处理细胞上清液释放乳酸脱氢酶的影响

(1)细胞计数。

(2)细胞铺板:将处于对数生长期的成纤维细胞,接种于 96 孔板,细胞数量为 5000 个细胞每孔,每组设置 3 个副孔,每孔 DMEM 培养液体积为 $100\mu\text{l}$,于 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 培养箱中培养。细胞分组为:背景空白对照组、背景加芍药苷空白对照组,未照光对照组、未照光最大酶活性对照组、未照光加芍药苷组、照光处理组及照光加芍药苷处理组。

(3)细胞加药:细胞密度为 80-90%后,对细胞进行加药处理,加药处理组加入 $400\mu\text{M}$ 芍药苷,未加药组加入相同体积的 DMSO,放回培养箱中继续培养。

(4)细胞照光:加药预处理 3 小时后,对细胞进行 UVA 照射,剂量为 $30\text{J}/\text{cm}^2$,照光后各孔加入 $200\mu\text{l}$ 无血清培养基,放回培养箱中继续培养,其中需要加芍药苷的处理组在照光后再次加入 $400\mu\text{M}$ 芍药苷后继续放回培养箱中培养。

(4)在到达预定检测时间点的前 1 小时从培养箱中取出细胞培养板,在“未照光处理最大酶活性对照组”中加入试剂盒的 LDH 释放试剂组分,加入体积为 10% 的原有培养液体积。加入 LDH 释放试剂后,在孔板内反复轻柔吹打数次进行混匀,然后继续在细胞培养箱中孵育。

(5)到达预定检测时间时,将培养板用多孔板离心机 400g 离心 5 分钟。分别取 $120\mu\text{l}$ 各孔的上清液,加入到一新的 96 孔板相应孔中,在孵育后进行样品测定。

(7)样品测定:各孔分别加入 $60\mu\text{l}$ LDH 检测工作液,混匀。室温用铝箔包裹后置于水平摇床缓慢摇动 30 分钟,然后用酶标仪在 490nm 处测定吸光度。

(8)计算:各孔吸光度减去背景空白对照孔吸光度,其中各加药组吸光度减去背景加芍药苷空白对照组吸光度,LDH 释放百分比 (%) = (处理组吸光度-未照光对照孔吸光度) / (细胞最大酶活性的吸光度-未照光对照孔吸光度) $\times 100$ 。

2.2.8 芍药苷加药对 UVA 处理细胞中 YO-PRO-1/PI 荧光染色的影响

(1)细胞计数。

(2) 细胞铺板: 将处于对数生长期的成纤维细胞接种于 12 孔板中, 每孔细胞量约为 1×10^5 个, 每孔 DMEM 培养液体积为 1ml, 于 5% CO₂, 37°C 培养箱中继续培养。

(3) 细胞加药: 细胞密度为 80-90% 后, 对细胞进行加药处理, 加药处理组加入 400 μ M 芍药苷, 未加药组加入相同体积的 DMSO, 放回培养箱中继续培养。

(4) 细胞照光: 加药预处理 3 小时后, 对细胞进行 UVA 照射, 剂量为 30J/cm², 照射后于培养箱继续培养, 其中加药处理组在照光后再次加入 400 μ M 芍药苷后继续放回培养箱中培养, 24 小时后进行小分子荧光染料染色。

(4) 配制 YO-PRO-1/PI 检测工作液: 每 1ml 检测工作液含 YO-PRO-1 (1000 \times) 1 μ l、PI (1000 \times) 1 μ l、检测缓冲液 998 μ l。

(5) 染色: 吸除培养液, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 每孔加入 500 μ l 的 YO-PRO-1/PI 检测工作液, 37°C 避光孵育 20 分钟。孵育结束后, 在荧光显微镜下观察荧光效果并拍照。

2.3 统计学分析

同第一部分

3 结果

3.1 不同浓度芍药苷对细胞毒性影响

为了后续实验的芍药苷用药,我们用不同浓度的芍药苷(0 μ M、100 μ M、200 μ M、400 μ M、800 μ M)对细胞进行处理,加药处理 24 小时后,用 MTS 法检测细胞活力。如图 3.1 所示,所选 4 个浓度芍药苷对细胞活力均无显著损伤作用 ($P>0.05$),但与其他三组浓度相比,800 μ M 的芍药苷浓度对细胞活力有所抑制,因此从既不影响细胞活力又能对照光处理后的细胞起效的角度考虑,我们选择 400 μ M 浓度的芍药苷进行后续实验。

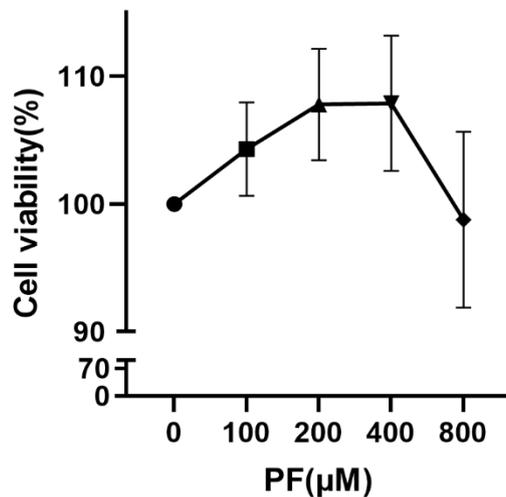


图 3.1 不同浓度芍药苷对成纤维细胞细胞毒性影响

4 个浓度的芍药苷对成纤维细胞无明显毒性 ($P>0.05$)。

3.2 芍药苷减轻 UVA 诱导的线粒体途径凋亡

前期研究中,我们已经明确芍药苷通过 Nrf2/HO-1 通路抑制 UVA 诱导的成纤维细胞内的氧化应激,而氧化应激参与了 UVA 诱导的线粒体途径凋亡,因此为了探索芍药苷是否会同样抑制线粒体途径凋亡,我们将细胞分为四组,分别为对照组、芍药苷组、照光组及照光加芍药苷组。在成纤维细胞照光处理前 3 个小时,在芍药苷处理组的细胞培养液中加入适量体积的芍药苷溶液(100mM),使其稀释 250 倍,终浓度为工作浓度(400 μ M),对照组的细胞培养液中加入等体积的 DMSO 溶液;成纤维细胞照光处理后,芍药苷处理组细胞加 400 μ M 浓度芍药苷的细胞培养液继

续培养，对照组的细胞培养液同样加入等体积的 DMSO 溶液继续培养。分别于细胞照光处理 24 小时后进行 JC-1 荧光染色检测线粒体膜电位变化和在细胞照光处理 2 小时后提取细胞蛋白进行 western blot 实验检测线粒体途径凋亡分子变化。JC-1 结果如图 3.2 所示，单独照光组在照光处理后 24 小时，其与对照组相比线粒体膜电位明显下降，而在加芍药苷处理组的细胞在照光后，其虽与对照组相比线粒体膜电位有所下降，但与单独照光组相比，大部分细胞线粒体膜电位的下降受到抑制。Western blot 结果如图 3.3 所示，未经任何处理的成纤维细胞在照光后，Bax、Cyto c、cleaved caspase-9 等线粒体途径凋亡分子表达升高，加芍药苷处理的成纤维细胞照光后其线粒体途径凋亡相关分子的表达受到抑制。此部分实验说明，芍药苷可减轻 UVA 照射引起的成纤维细胞线粒体途径凋亡的激活。

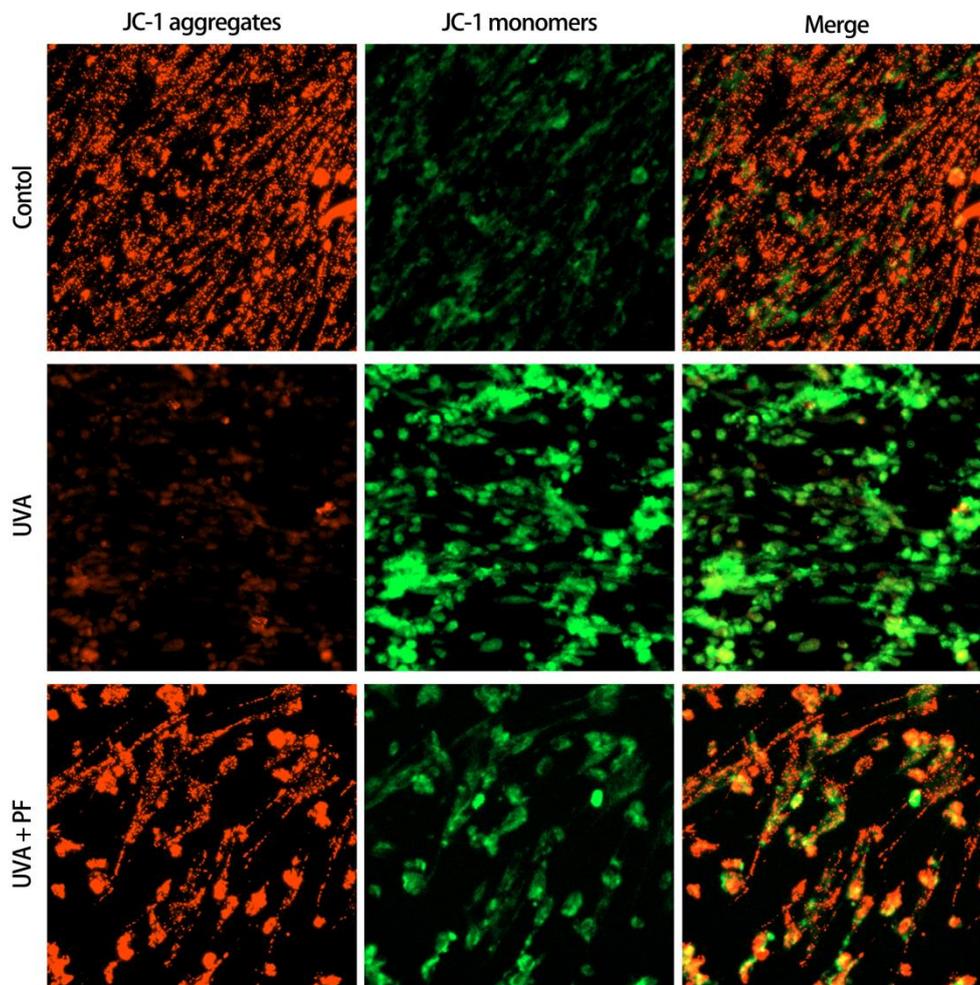


图 3.2 芍药苷抑制 UVA 诱导的线粒体膜电位下降

HDF 细胞在 UVA 照光处理后，绿色荧光比例明显增多，线粒体膜电位下降，芍药苷加药处理组的细胞照光后，其绿色荧光比例明显下降，线粒体膜电位较单独照光组升高。

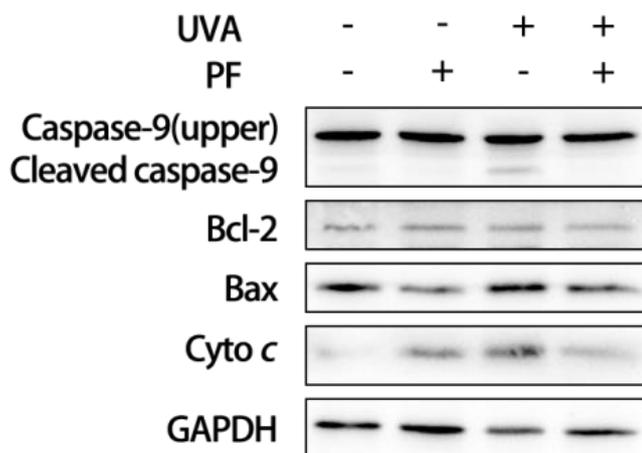


图 3.3 芍药苷抑制 UVA 诱导的线粒体途径凋亡分子表达

HDF 细胞在 UVA 照光处理后，线粒体途径凋亡分子表达升高，芍药苷加药处理组在照光后的线粒体途径凋亡分子的表达较单独照光组明显下降。

3.3 芍药苷抑制 UVA 诱导成纤维细胞发生细胞焦亡

为了研究芍药苷是否会抑制细胞焦亡的激活，我们设立了对照组、照光组及芍药苷处理加照光组，在照光前后分别加入 400 μ M 芍药苷处理。在光镜下观察细胞形态变化。如图 3.4 所示，成纤维细胞照光后，大部分细胞出现焦亡形态变化，细胞肿胀并且细胞膜表面有许多气泡状突出物，芍药苷处理组细胞照光后与单独照光相比发生细胞焦亡形态的细胞比例明显减少，形态规则的贴壁细胞比例明显增多。

应用 MTS 法及检测乳酸脱氢酶释放活性百分比确定细胞损伤情况，如图 3.5 所示，单独照光组细胞出现了明显的活力下降以及乳酸脱氢酶释放增多 ($P<0.05$)，而照光+芍药苷组细胞与单独照光组相比，其细胞活力的下降受到抑制、乳酸脱氢酶的释放降低 ($P<0.05$)。YO-PRO-1/PI 双荧光染色结果如图 3.6 所示，成纤维细胞照光后，YO-PRO-1/PI 双染阳性细胞比例明显增加，这部分结果表明芍药苷可以抑制 UVA 诱导的成纤维细胞出现的细胞焦亡表现。

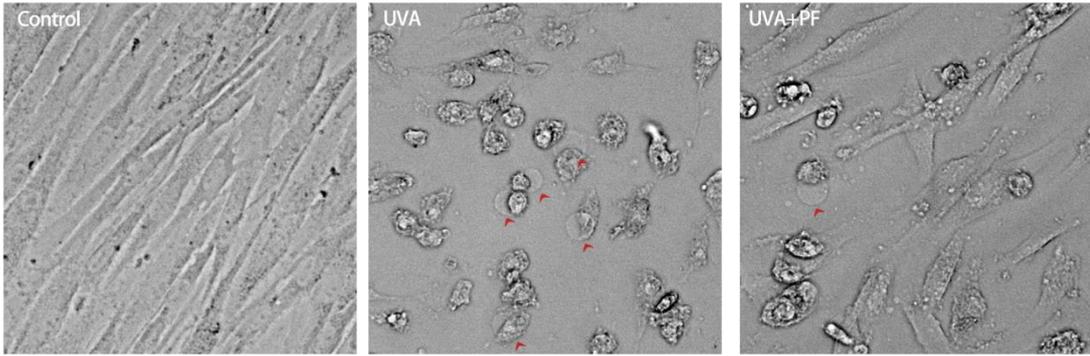


图 3.4 芍药苷抑制 UVA 诱导的细胞焦亡形态学改变

光镜下观察细胞形态。HDF 细胞照光后，细胞出现焦亡形态变化。加芍药苷处理细胞照光后焦亡形态细胞减少，梭形贴壁细胞比例增多。红色箭头表示焦亡细胞的气泡状突出物形态特征。

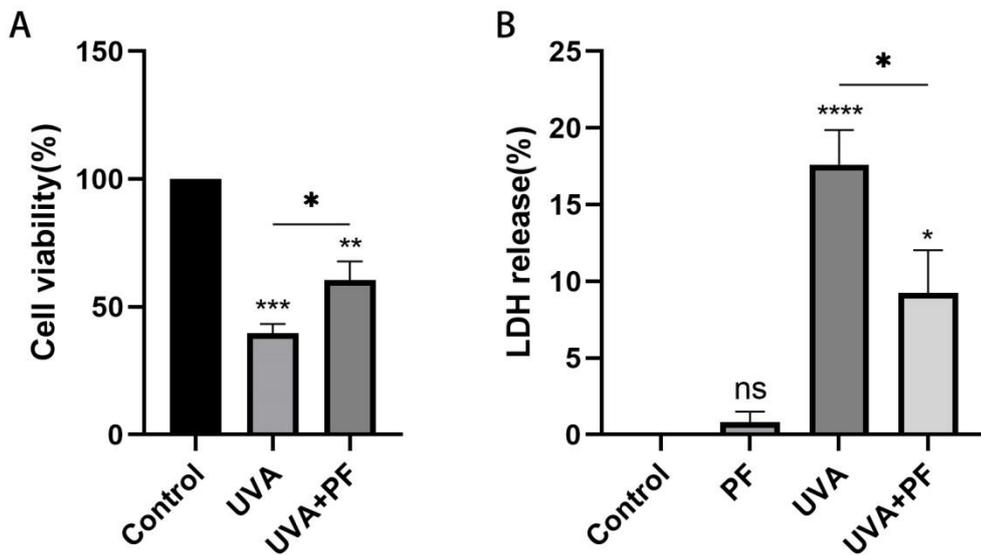


图 3.5 芍药苷抑制 UVA 造成的成纤维细胞损伤

A. MTS 法检测细胞活力。芍药苷处理可以抑制 UVA 导致的 HDF 细胞活力下降。B. 乳酸脱氢酶释放活性检测细胞损伤。芍药苷处理可以抑制 UVA 导致的 HDF 细胞膜损伤。结果表示为均数±标准误。 P 值小于 0.05 具有统计学意义，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ ，****表示 $P < 0.0001$ 。

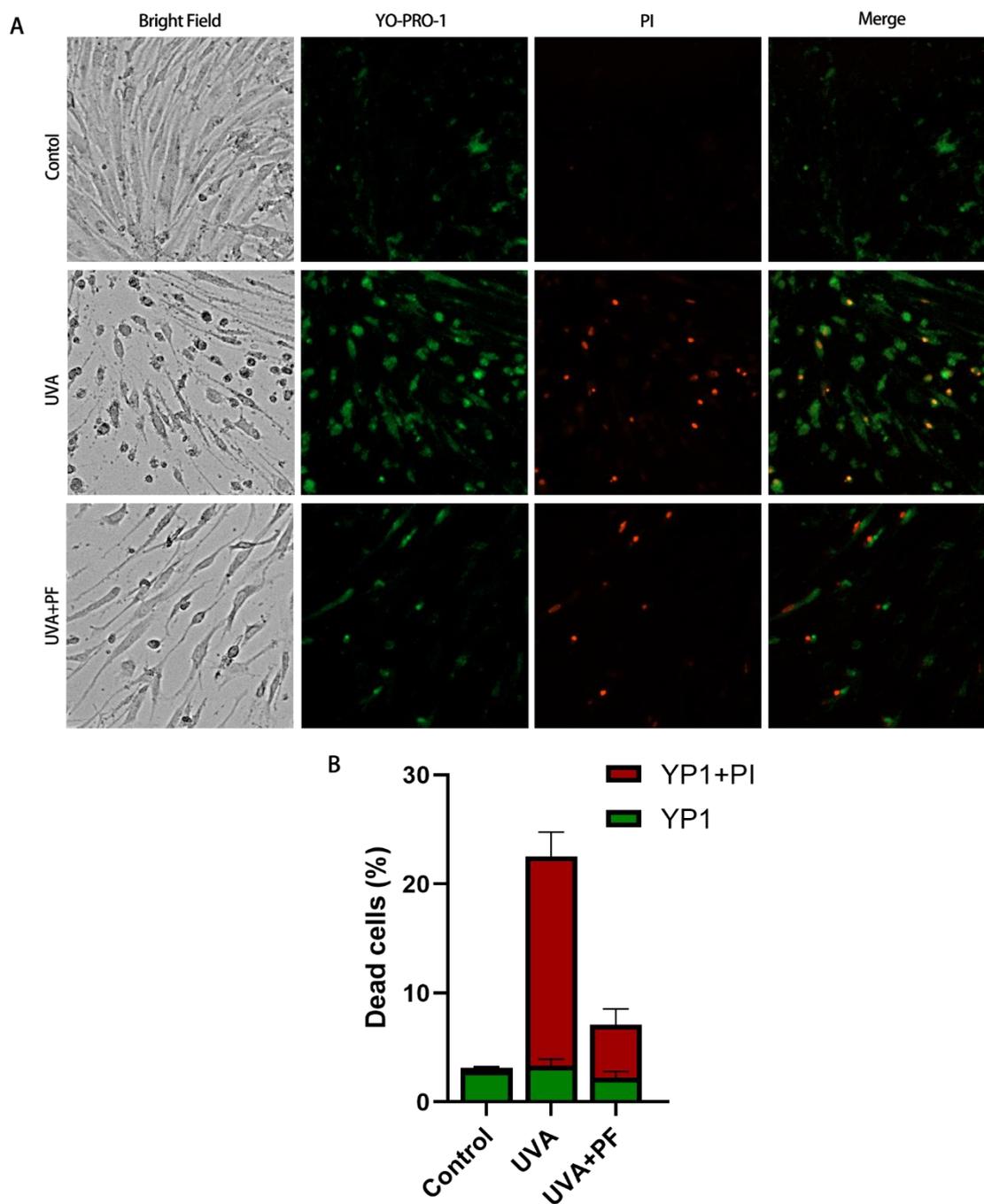


图 3.6 芍药苷抑制 UVA 诱导的细胞死亡

A. YO-PRO-1/PI 双荧光染色。HDF 细胞照光后出现细胞凋亡和细胞焦亡，芍药苷处理减少照光处理的 HDF 细胞凋亡和细胞焦亡比例。B. 荧光染色量化结果。结果表示为均数±标准误。

3.4 芍药苷抑制 caspase-3/GSDME 焦亡通路激活

为了探究芍药苷是否通过抑制 caspase-3/GSDME 通路的激活，来实现对 UVA

诱导成纤维细胞焦亡的抑制作用,我们将细胞分为四组,分别为对照组、芍药苷组、照光组及照光加芍药苷处理组,芍药苷处理组加药方式同 3.2 部分。在细胞处理后提取细胞蛋白,应用 western blot 检测 caspase-3/GSDME 通路上的分子,结果如图 3.7 所示,与单独照光组相比,照光加芍药苷处理组 cleaved caspase-3、GSDME-N、cleaved PARP 的激活受到抑制,说明芍药苷可以抑制 UVA 诱导的成纤维细胞中 caspase-3/GSDME 通路的激活。

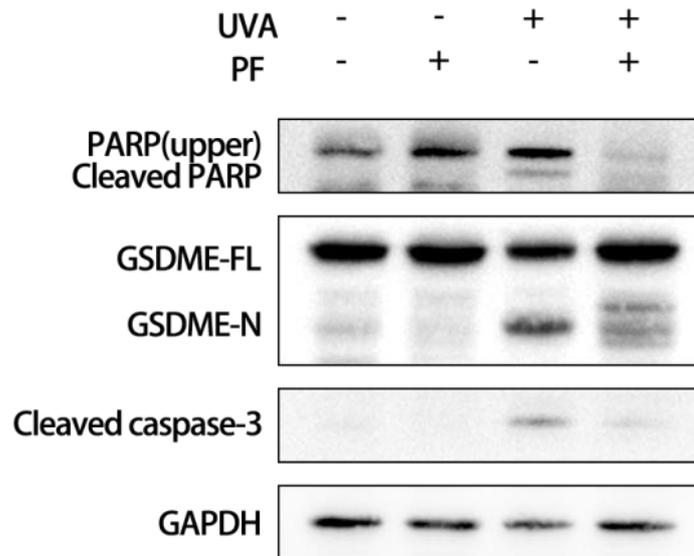


图 3.7 芍药苷抑制 caspase-3/GSDME 通路激活

HDF 细胞在 UVA 照光处理后, caspase-3、GSDME、PARP 分子出现剪切激活,芍药苷加药处理抑制了这些分子在照光后的剪切激活。

4 讨论

在 UVA 照射成纤维细胞后, 会引起细胞发生氧化应激反应, 细胞内产生大量 ROS, 导致细胞内各种生物大分子的氧化损伤, 这些损伤根据严重程度不同可能会导致皮肤出现光损伤、退行性老化甚至皮肤癌变^[82]。因此, 有一些研究中发现对氧化损伤的干预可以有效对抗 UVA 对皮肤损害^[7,62]。在前期研究中, 我们课题组已经发现芍药苷可以通过增加成纤维细胞内抗氧化基因 Nrf2、HO-1、NQ-O1 减轻 UVA 对细胞的氧化应激损伤^[19]。在此部分研究中, 我们使用芍药苷对成纤维细胞加药处理, 发现芍药苷可以减轻 UVA 引起成纤维细胞的线粒体途径凋亡和细胞焦亡。结合上一部分实验结果, 我们可以得出以下结论, 芍药苷通过减轻氧化应激抑制 UVA 诱导的线粒体途径凋亡及细胞焦亡。并且我们推测芍药苷是通过 Nrf2/HO-1 通路减轻 UVA 引起的氧化应激, 继而抑制成纤维细胞的线粒体途径凋亡和细胞焦亡。芍药苷通过激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化作用的应用并不罕见, 芍药苷通过 Nrf2/HO-1 通路减轻叔丁基过氧化氢对人脐静脉内皮细胞的氧化损伤, 提高了皮瓣移植的存活率^[83]。研究发现芍药苷通过 AMPK/Nrf2 通路减轻缺血再灌注模型中心肌细胞的氧化应激^[84]。在芍药苷对胆汁淤积性肝损伤模型的治疗研究中, 体外细胞实验 Nrf2 的敲低和过表达分别显示出芍药苷治疗作用的减弱和增强, 而体内实验 Nrf2 敲除鼠与野生型鼠相比, 芍药苷未显示出明显治疗作用, 说明芍药苷是通过 Nrf2 对胆汁淤积性肝损伤进行治疗的^[85]。

在这一部分研究中, 我们首先发现芍药苷可以抑制 UVA 诱导成纤维细胞的线粒体途径凋亡, 具体是通过检测线粒体膜电位以及 Bax、Bcl-2、Cyto c、caspase-9 等线粒体途径凋亡分子验证的。这一结果与芍药苷在其他领域关于线粒体途径凋亡的研究类似: 芍药苷可显著减轻缺血再灌注模型中心肌细胞中的氧化应激水平, 使 Bax 表达降低 bcl-2 表达升高^[84]。芍药苷预处理降低 H₂O₂ 处理后 Cleaved caspase3、Cleaved caspase7 水平, 升高 Bcl-2、Bcl-x1 水平, 从而减轻对施万细胞的损伤^[86]。芍药苷可显著降低蛛网膜下腔出血后 Bax/Bcl-2 比例及活性 caspase-3 从而减轻早期脑损伤^[87]。芍药苷既可减少 A β 25-35 诱导的细胞内 ROS 生成, 也能抑制线粒体途径凋亡, 从而减缓阿尔兹海默症的进程^[88]。

我们首次发现芍药苷对 caspase-3/GSDME 细胞焦亡有抑制作用。但在其他研究中, 目前只发现芍药苷对 GSDMD 依赖的细胞焦亡产生抑制作用。我们推测一方面是 UVA 未在成纤维细胞内激活 GSDMD 依赖的细胞焦亡, 另一方面芍药苷的药理

作用十分复杂，其可作为不同分子通路的共同上游的干预因素，对较下游的细胞焦亡效应分子进行调控。另外与芍药苷对 GSDME 的抑制作用不同的是，有一些中药是通过激活 GSDME 焦亡通路来实现抗癌作用的。雷公藤内酯通过诱导 GSDME 的焦亡清除头颈癌细胞^[44]。从莪术中提取的吉马酮可通过此通路诱导 HepG2 细胞死亡^[89]。从藏木香中提取的组分 ATL 可通过增加细胞内 ROS 诱导 GSDME 依赖的细胞焦亡，起到抗甲状腺未分化癌的作用^[90]。我们推测芍药苷与这些中药在 GSDME 依赖的细胞焦亡中完全相反作用的原因，是芍药苷其在 UVA 诱导的光损伤中主要发挥抗氧化作用，而诱导细胞焦亡的中药组分可能在其抗癌领域中发挥诱导细胞氧化应激或加重细胞损伤的作用。

我们这一部分的实验结果，为临床应用芍药苷治疗 UVA 引起的光损伤提供了更充分的理论依据。另外我们发现芍药苷参与抑制 GSDME 依赖的细胞焦亡作用，为其他领域 GSDME 细胞焦亡引起的损伤或疾病的研究提供了新的治疗方向与手段。

5 结论

- (1) 芍药苷抑制 UVA 引起的成纤维细胞中线粒体途径凋亡的激活。
- (2) 芍药苷抑制 UVA 诱导的成纤维细胞焦亡。

本研究创新性的自我评价

细胞焦亡是近几年发现的一种新的细胞死亡方式，它是一种以在细胞膜上穿孔使细胞发生通透性改变进而胀亡释放细胞内容物和炎症因子为特点的细胞死亡。细胞内外的刺激因素可诱导细胞发生焦亡，但 UVA 是否会引起细胞焦亡的研究还处于空白。本研究首次发现 UVA 可诱导真皮成纤维细胞发生焦亡，并明确了参与的焦亡通路是 caspase-3/GSDME 通路，而非 GSDMD 依赖的焦亡通路。我们进一步明确了 UVA 是通过激活线粒体途径凋亡活化 caspase-3，进而激活 caspase-3/GSDME 焦亡通路。

在我们课题组前期“芍药苷通过 Nrf2/HO-1 通路减轻 UVA 对成纤维细胞的氧化应激”的研究基础上，本研究既明确了 UVA 通过氧化应激诱导成纤维细胞焦亡和线粒体途径凋亡，又完善了芍药苷通过发挥抗氧化作用对线粒体途径凋亡和细胞焦亡起到了抑制作用，其中我们首次发现芍药苷可以对 caspase-3/GSDME 焦亡通路起到抑制作用。

本研究为 UVA 引起皮肤光损伤提供了新的治疗靶点，也为芍药苷防治光损伤提供了新的理论依据，同时为 GSDME 依赖的细胞焦亡引起的其他疾病提供新的治疗策略。

参考文献

- [1] D'orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, et al. UV radiation and the skin[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (6): 12222-48.
- [2] Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, et al. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types[J]. *Exp Dermatol*, 2014, 23 Suppl 1: 7-12.
- [3] Yaar M, Gilchrist B A. Photoaging: mechanism, prevention and therapy[J]. *Br J Dermatol*, 2007, 157 (5): 874-87.
- [4] Krutmann J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis[J]. *J Dermatol Sci*, 2000, 23 Suppl 1: S22-6.
- [5] Kammeyer A, Luiten R M. Oxidation events and skin aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2015, 21: 16-29.
- [6] Liu S, Mohri S, Manabe Y, et al. Gly-Pro protects normal human dermal fibroblasts from UVA-induced damages via MAPK-NF-kappaB signaling pathway[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2022, 237: 112601.
- [7] Mo Q, Li S, You S, et al. Puerarin Reduces Oxidative Damage and Photoaging Caused by UVA Radiation in Human Fibroblasts by Regulating Nrf2 and MAPK Signaling Pathways[J]. *Nutrients*, 2022, 14 (22).
- [8] Zychlinsky A, Prevost M C, Sansonetti P J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages[J]. *Nature*, 1992, 358 (6382): 167-9.
- [9] Al Mamun A, Mimi A A, Aziz M A, et al. Role of pyroptosis in cancer and its therapeutic regulation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 910: 174444.
- [10] Zheng Z, Deng W, Lou X, et al. Gasdermins: pore-forming activities and beyond[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2020, 52 (5): 467-474.
- [11] Feng S, Fox D, Man S M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death[J]. *J Mol Biol*, 2018, 430 (18 Pt B): 3068-3080.
- [12] Brem R, Guven M, Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 107: 101-109.
- [13] Shorrocks J, Paul N D, Mcmillan T J. The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128 (3): 685-93.
- [14] Wang J, Yano S, Xie K, et al. Genome-Wide RNA Sequencing Analysis in Human Dermal Fibroblasts Exposed to Low-Dose Ultraviolet A Radiation[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13 (6).

- [15] Bernerd F, Asselineau D. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging[J]. *Cell Death Differ*, 1998, 5 (9): 792-802.
- [16] Xue N, Liu Y, Jin J, et al. Chlorogenic Acid Prevents UVA-Induced Skin Photoaging through Regulating Collagen Metabolism and Apoptosis in Human Dermal Fibroblasts[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (13).
- [17] Wang P W, Hung Y C, Lin T Y, et al. Comparison of the Biological Impact of UVA and UVB upon the Skin with Functional Proteomics and Immunohistochemistry[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8 (12).
- [18] Xie H, Zhou L, Liu F, et al. Autophagy induction regulates aquaporin 3-mediated skin fibroblast ageing[J]. *Br J Dermatol*, 2022, 186 (2): 318-333.
- [19] Lu Y S, Jiang Y, Yuan J P, et al. UVA Induced Oxidative Stress Was Inhibited by Paeoniflorin/Nrf2 Signaling or PLIN2[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 736.
- [20] Wang J, Ma W, Si C, et al. Exosome-mediated miR-4655-3p contributes to UV radiation-induced bystander effects[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 418 (1): 113247.
- [21] Choi M, Park M, Lee S, et al. Establishment of Immortalized Primary Human Foreskin Keratinocytes and Their Application to Toxicity Assessment and Three Dimensional Skin Culture Construction[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25 (3): 296-307.
- [22] Choi M, Park M, Lee S, et al. Establishment of Nrf2-deficient HaCaT and immortalized primary human foreskin keratinocytes and characterization of their responses to ROS-induced cytotoxicity[J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 61: 104602.
- [23] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 171.
- [24] Li H, Yuan L, Li X, et al. Isoorientin Attenuated the Pyroptotic Hepatocyte Damage Induced by Benzo[a]pyrene via ROS/NF- κ B/NLRP3/Caspase-1 Signaling Pathway[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (8).
- [25] Zhou B, Zhang J Y, Liu X S, et al. Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis[J]. *Cell Res*, 2018, 28 (12): 1171-1185.
- [26] Wang Y, Shi P, Chen Q, et al. Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation[J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11 (12): 1069-1082.
- [27] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 128.

- [28] Shao F, Fitzgerald K A. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis[J]. *J Mol Biol*, 2022, 434 (4): 167461.
- [29] Wang L, Qin X, Liang J, et al. Induction of Pyroptosis: A Promising Strategy for Cancer Treatment[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 635774.
- [30] Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 211.
- [31] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526 (7575): 660-5.
- [32] Fernandez-Duran I, Quintanilla A, Tarrats N, et al. Cytoplasmic innate immune sensing by the caspase-4 non-canonical inflammasome promotes cellular senescence[J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (6): 1267-1282.
- [33] Downs K P, Nguyen H, Dorfleutner A, et al. An overview of the non-canonical inflammasome[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76: 100924.
- [34] 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.
- [35] Jiang S, Gu H, Zhao Y, et al. Teleost Gasdermin E Is Cleaved by Caspase 1, 3, and 7 and Induces Pyroptosis[J]. *J Immunol*, 2019, 203 (5): 1369-1382.
- [36] Wei K C, Wei W J, Liao C L, et al. Discrepant Activation Pattern of Inflammation and Pyroptosis Induced in Dermal Fibroblasts in Response to Dengue Virus Serotypes 1 and 2 and Nonstructural Protein 1[J]. *Microbiol Spectr*, 2023: e0358622.
- [37] Ji X, Chen H, Xie L, et al. The study of GSDMB in pathogenesis of psoriasis vulgaris[J]. *PLoS One*, 2023, 18 (1): e0279908.
- [38] Kim J H, Lim S R, Jung D H, et al. Grifola frondosa Extract Containing Bioactive Components Blocks Skin Fibroblastic Inflammation and Cytotoxicity Caused by Endocrine Disrupting Chemical, Bisphenol A[J]. *Nutrients*, 2022, 14 (18).
- [39] Song C, Zhang W, Xiao T, et al. Reduction of miR-133a-3p contributes to apoptosis and gasdermin E-mediated pyroptosis of keratinocytes in skin exposed to ultraviolet B radiation[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2023, 238: 112613.
- [40] Liu J, Zhong Y, Liu H, et al. Oncostatin M sensitizes keratinocytes to UVB-induced inflammation via GSDME-mediated pyroptosis[J]. *J Dermatol Sci*, 2021, 104 (2): 95-103.
- [41] Chen Y, Xiao T, Xu S, et al. Ultraviolet B induces proteolytic cleavage of the pyroptosis inducer

- gasdermin E in keratinocytes[J].*J Dermatol Sci*,2020, 100 (2): 160-163.
- [42] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, et al.Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J].*Cell Death Differ*,2018, 25 (3): 486-541.
- [43] Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al.Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J].*Aging (Albany NY)*,2016, 8 (4): 603-19.
- [44] Cai J, Yi M, Tan Y, et al.Natural product triptolide induces GSDME-mediated pyroptosis in head and neck cancer through suppressing mitochondrial hexokinase-II[J].*J Exp Clin Cancer Res*,2021, 40 (1): 190.
- [45] Yang X, Chen G, Yu K N, et al.Cold atmospheric plasma induces GSDME-dependent pyroptotic signaling pathway via ROS generation in tumor cells[J].*Cell Death Dis*,2020, 11 (4): 295.
- [46] Yu J, Li S, Qi J, et al.Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells[J].*Cell Death Dis*,2019, 10 (3): 193.
- [47] Sand J, Haertel E, Biedermann T, et al.Expression of inflammasome proteins and inflammasome activation occurs in human, but not in murine keratinocytes[J].*Cell Death Dis*,2018, 9 (2): 24.
- [48] Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, et al.The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes[J].*Curr Biol*,2007, 17 (13): 1140-5.
- [49] Grossi S, Fenini G, Kockmann T, et al.Inactivation of the Cytoprotective Major Vault Protein by Caspase-1 and -9 in Epithelial Cells during Apoptosis[J].*J Invest Dermatol*,2020, 140 (7): 1335-1345 e10.
- [50] Xu W, Che Y, Zhang Q, et al.Apaf-1 Pyroptosome Senses Mitochondrial Permeability Transition[J].*Cell Metab*,2021, 33 (2): 424-436.e10.
- [51] Taabazuing C Y, Okondo M C, Bachovchin D A.Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages[J].*Cell Chem Biol*,2017, 24 (4): 507-514.e4.
- [52] Chen Y, Lian N, Chen S, et al.GSDME deficiency leads to the aggravation of UVB-induced skin inflammation through enhancing recruitment and activation of neutrophils[J].*Cell Death Dis*,2022, 13 (10): 841.
- [53] Wang Y, Gao W, Shi X, et al.Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J].*Nature*,2017, 547 (7661): 99-103.
- [54] Zhang X, Zhang P, An L, et al.Miltirone induces cell death in hepatocellular carcinoma cell through GSDME-dependent pyroptosis[J].*Acta Pharm Sin B*,2020, 10 (8): 1397-1413.

- [55] Peng Z, Wang P, Song W, et al. GSDME enhances Cisplatin sensitivity to regress non-small cell lung carcinoma by mediating pyroptosis to trigger antitumor immunocyte infiltration[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 159.
- [56] Shen X, Wang H, Weng C, et al. Caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis contributes to chemotherapy drug-induced nephrotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 186.
- [57] Zheng Z Y, Yang P L, Li R Y, et al. STAT3 β disrupted mitochondrial electron transport chain enhances chemosensitivity by inducing pyroptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 171-183.
- [58] Zhang Z, Zhang H, Li D, et al. Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2021.
- [59] Zhou B R, Yin H B, Xu Y, et al. Baicalin protects human skin fibroblasts from ultraviolet A radiation-induced oxidative damage and apoptosis[J]. *Free Radic Res*, 2012, 46 (12): 1458-71.
- [60] Ribeiro F M, De Oliveira M M, Singh S, et al. Ceria Nanoparticles Decrease UVA-Induced Fibroblast Death Through Cell Redox Regulation Leading to Cell Survival, Migration and Proliferation[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 577557.
- [61] Hwang J Y, Yadav A K, Jang B C, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of *Stachys riederi* var. *japonica* ethanol extract on UVA-irradiated human dermal fibroblasts[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43 (3): 1497-1504.
- [62] Lu Z, Xia Q, Cheng Y, et al. Hesperetin attenuates UVA-induced photodamage in human dermal fibroblast cells[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2022, 21 (11): 6261-6269.
- [63] Xu X, Sun G, Liu J, et al. Akt activation-dependent protective effect of wild ginseng adventitious root protein against UVA-induced NIH-3T3 cell damage[J]. *Wound Repair Regen*, 2021, 29 (6): 1006-1016.
- [64] Zheng Z, Bian Y, Zhang Y, et al. Metformin activates AMPK/SIRT1/NF-kappaB pathway and induces mitochondrial dysfunction to drive caspase3/GSDME-mediated cancer cell pyroptosis[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19 (10): 1089-1104.
- [65] Rogers C, Erkes D A, Nardone A, et al. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1689.
- [66] Op De Beeck K, Van Camp G, Thys S, et al. The DFNA5 gene, responsible for hearing loss and involved in cancer, encodes a novel apoptosis-inducing protein[J]. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19 (9): 965-73.

- [67] Wu M Y, Yiang G T, Lai T T, et al. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3420187.
- [68] Chen Z, Wang C, Yu N, et al. INF2 regulates oxidative stress-induced apoptosis in epidermal HaCaT cells by modulating the HIF1 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 151-161.
- [69] Sinha K, Das J, Pal P B, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis[J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87 (7): 1157-80.
- [70] Li Y, Wang X, Lin J, et al. Natural flavonoid sinensetin inhibits cisplatin-induced pyroptosis and attenuates intestinal injury[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869 (3): 166637.
- [71] Ding Z, Zhao J, Wang X, et al. Total extract of *Abelmoschus manihot* L. alleviates uric acid-induced renal tubular epithelial injury via inhibition of caspase-8/caspase-3/NLRP3/GSDME signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 907980.
- [72] Ren L, Zhang Z, Zhao W, et al. Qingchang Wenzhong Decoction Prevents the Occurrence of Intestinal Tumors by Regulating Intestinal Microbiota and Gasdermin E[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 917323.
- [73] Ji Y, Wang T, Wei Z F, et al. Paeoniflorin, the main active constituent of *Paeonia lactiflora* roots, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing the synthesis of type I collagen[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149 (3): 825-32.
- [74] Xu L, Wang H, Yu Q Q, et al. The monomer derivative of paeoniflorin inhibits macrophage pyroptosis via regulating TLR4/ NLRP3/ GSDMD signaling pathway in adjuvant arthritis rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101 (Pt A): 108169.
- [75] Hong Z, Zhang X, Zhang T, et al. The ROS/GRK2/HIF-1 α /NLRP3 Pathway Mediates Pyroptosis of Fibroblast-Like Synoviocytes and the Regulation of Monomer Derivatives of Paeoniflorin[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 4566851.
- [76] Jiang Z, Chen J, Chen J, et al. Anti-inflammatory effects of paeoniflorin caused by regulation of the hif1 α /miR-210/caspase1/GSDMD signaling pathway in astrocytes: a novel strategy for hypoxia-induced brain injury in rats[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43 (4): 410-418.
- [77] Tian D D, Wang M, Liu A, et al. Antidepressant Effect of Paeoniflorin Is Through Inhibiting Pyroptosis CASP-11/GSDMD Pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58 (2): 761-776.
- [78] Yuan J, Lu Y, Wang H, et al. Paeoniflorin Resists H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Melanocytes by JNK/Nrf2/HO-1 Pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 536.
- [79] Li L, Wang H, Zhao S, et al. Paeoniflorin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute liver injury

by inhibiting oxidative stress and inflammation via SIRT1/FOXO1a/SOD2 signaling in rats[J].Phytother Res,2022, 36 (6): 2558-2571.

[80] Wang X, Hao J C, Shang B, et al.Paeoniflorin ameliorates oxidase stress in Glutamate-stimulated SY5Y and prenatally stressed female offspring through Nrf2/HO-1 signaling pathway[J].J Affect Disord,2021, 294: 189-199.

[81] Zhu X, Wang K, Zhou F, et al.Paeoniflorin attenuates atRAL-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in retinal pigment epithelial cells via triggering Ca(2+)/CaMKII-dependent activation of AMPK[J].Arch Pharm Res,2018, 41 (10): 1009-1018.

[82] Elwood J M, Jopson J.Melanoma and sun exposure: an overview of published studies[J].Int J Cancer,1997, 73 (2): 198-203.

[83] Jiang J, Dong C, Zhai L, et al.Paeoniflorin Suppresses TBHP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells via the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway and Improves Skin Flap Survival[J].Front Pharmacol,2021, 12: 735530.

[84] Yu W, Sun H, Tan Y, et al.Paeoniflorin Protects H9c2 Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Induced Injury via Regulating the AMPK/Nrf2 Signaling Pathway[J].Evid Based Complement Alternat Med,2022, 2022: 7667770.

[85] Mao L, Chen J, Cheng K, et al.Nrf2-Dependent Protective Effect of Paeoniflorin on alpha-Naphthalene Isothiocyanate-Induced Hepatic Injury[J].Am J Chin Med,2022, 50 (5): 1331-1348.

[86] Zhang D, Yang B, Chang S Q, et al.Protective effect of paeoniflorin on H(2)O(2) induced Schwann cells injury based on network pharmacology and experimental validation[J].Chin J Nat Med,2021, 19 (2): 90-99.

[87] Wang T, Xu L, Gao L, et al.Paeoniflorin attenuates early brain injury through reducing oxidative stress and neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats[J].Metab Brain Dis,2020, 35 (6): 959-970.

[88] Wang K, Zhu L, Zhu X, et al.Protective effect of paeoniflorin on Aβ25-35-induced SH-SY5Y cell injury by preventing mitochondrial dysfunction[J].Cell Mol Neurobiol,2014, 34 (2): 227-34.

[89] Sun X, Zhong X, Ma W, et al.Germacrone induces caspase-3/GSDME activation and enhances ROS production, causing HepG2 pyroptosis[J].Exp Ther Med,2022, 24 (1): 456.

[90] Hu Y, Wen Q, Cai Y, et al.Alantolactone induces concurrent apoptosis and GSDME-dependent pyroptosis of anaplastic thyroid cancer through ROS mitochondria-dependent caspase

pathway[J].Phytomedicine,2023, 108: 154528.

综述

GSDME 介导的细胞焦亡及其在肿瘤方面的研究进展

细胞焦亡是近年来发现的一种新的细胞死亡形式，其被定义为 gasdermin 家族依赖的细胞程序性死亡。GSDME 最初作为与家族性遗传耳聋相关的分子被研究，随着细胞焦亡研究的增多，GSDME 被发现作为 gasdermin 蛋白家族的一员，也参与细胞焦亡的发生。GSDME 被经典凋亡执行分子 caspase-3 所剪切，从而将凋亡这一传统细胞死亡形式与细胞焦亡联系起来，其内在的关联网络调控机制还十分复杂，暂未被研究透彻。而后 GSDME 多被作为化疗药物诱导肿瘤细胞焦亡的分子，参与肿瘤治疗的研究。本篇综述围绕着 GSDME，聚焦在细胞程序性死亡形式，包括凋亡与焦亡的关联及 GSDME 介导的焦亡与经典焦亡通路的联系，并总结了近几年关于 GSDME 焦亡相关的癌症治疗研究。

1.GSDME 蛋白概述

GSDME（也称为 DFNA5）属于 gasdermin 蛋白家族，其家族还包括 GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD 以及 Pejvakin (PJVK)。GSDME 在 1998 年被发现，过去一直被认为与听力丧失相关，其特定的突变形式诱导耳聋，与 GSDME 相关的耳聋以常染色体显性遗传和听力逐渐丧失为特征^[1]。编码 GSDME 的基因位于常染色体的 7p15，它由 10 个外显子组成，编码的蛋白含 496 个氨基酸，分子量为 55 kda。

细胞程序性死亡对于生物的生长，存活，稳态和先天性至关重要，细胞焦亡是一种新的细胞死亡形式，最早在 1992 年被报道^[2]，其被定义为是 gasdermin 家族依赖性的细胞程序性死亡^[3]，近几年的焦亡相关的研究越来越多。细胞焦亡的效应蛋白——Gasdermin 蛋白家族成员，除 PJVK 外，都在其 gasdermin-N 结构域具有内源性的致细胞死亡活性，在未剪切状态下，这种诱导细胞死亡的活性被 gasdermin-C 结构域所抑制^[4]。当受到外界刺激后，经过一系列通路激活，gasdermin-N 和 C 结构域间的蛋白水解，释放出 gasdermin-N 结构域，gasdermin-N 结构域移位到细胞膜上形成低聚体使胞膜穿孔^[5,6]。作为 gasdermin 家族的一员，近几年来 GSDME 在细胞焦亡中发挥的作用越来越受到关注。

2.GSDME 参与细胞焦亡的通路

到目前为止，已经提出了多个机制通路参与细胞焦亡，包括 caspase-1 依赖的经典焦亡途径和 caspase-4/5/11 依赖的非经典焦亡途径。

经典焦亡途径是 caspase-1 诱导的促炎性细胞死亡^[7], NLR 家族成员和 AIM 样受体也参与了经典焦亡途径。以 NLRP3 为代表, NLRP3 在感知到致病因素(DAMPs 或 PAMPs) 刺激后, 通过 ASCs 与 caspase-1 前体结合形成炎症小体^[8,9], 形成炎症小体后, 无活性的 caspase-1 前体通过自我蛋白水解形成有活性的 caspase-1。活化的 caspase-1 一方面剪切 GSDMD, 使其释放 GSDMD-N 结构域, 后者结合在细胞膜上并穿孔, 另一方面 caspase-1 可进一步激活 IL1 β 及 IL18 前体, 这两个炎症因子可通过 GSDMD-N 结构域聚合形成的孔被释放到细胞外, 加重炎症, 而细胞也因为膜上穿孔而内外渗透压失衡, 细胞逐渐肿胀最终死亡^[10]。

而非经典的焦亡途径由 caspase-4/5 (人)/caspase-11 (鼠) 介导^[11], 它们直接与细菌脂多糖(LPS) 结合而剪切激活, 激活的 caspase-4/5/11 与 caspase-1 类似, 进一步剪切 GSDMD 使其形成 N 结构域诱导细胞焦亡^[12], 而非经典途径中形成的膜上孔隙可进一步激活 NLRP3 炎症小体^[13], 释放 IL-1 β 和 IL-18 炎症因子促进炎症^[14,15]。

过去对于细胞焦亡的下游分子研究多集中于 GSDMD, 近几年才发现 GSDME 除了听力丧失相关, 还具有类似的促焦亡作用。研究表明, caspase-3 在 Asp270 之后切割 GSDME, 产生诱导焦亡的片段 GSDME-N, GSDME-N 靶向细胞膜, 从而诱导焦亡^[16-18]。而在所有 gasdermin 成员中, 除了 GSDMA 虽然也有成孔潜能的 gasdermin-N 结构域, 但它还未被发现在生理或病理刺激下被切割而在膜上穿孔, 而 GSDMB 可被 caspase-1 及颗粒酶 A 剪切, GSDMC 可被 caspase-8 于 gasdermin-C 结构域剪切而激活^[19]。在基因组水平上, GSDME 听力损失突变是由于外显子 8 发生跳跃而提前引入一个终止密码子, 导致 GSDME 的 C 端截短^[20], 所以在 GSDME 听力损失突变体中, gasdermin-C 结构域的丧失使得其出现功能获得性突变^[21], 即不依赖 caspase-3 剪切的穿孔活性, 由此推断可能听力丧失的机制与 GSDME 诱导焦亡相关。

过去 GSDME 一直是被作为 DFNA5——突变诱导常染色体显性遗传性耳聋的分子来进行研究的, 在 2001 年才发现 DFNA5 与细胞死亡相关, 尽管在当时还没有将这种细胞死亡形式与细胞焦亡联系起来, 仍认为这种细胞死亡属于凋亡^[22]。Webb, M. S. 等发现, DFNA5 可以被糖皮质激素诱导, DFNA5 mRNA 的诱导与糖皮质激素依赖性 CEM 细胞凋亡有关, 但单独表达 DFNA5 并不足以导致细胞凋亡^[23], 这可能是与其上游还存在激活其发挥生物学功能的分子有关。Op de Beeck, K. 及其团队首次证明了 DFNA5 是由两个区域组成, 当转染 HEK293T 细胞时, 第一个区域

诱导细胞凋亡，第二个区域掩盖并可能调节这种诱导凋亡的能力，他们还通过使用 DFNA5 敲除小鼠进行基因表达芯片分析，证实了 DFNA5 参与了生理环境下细胞凋亡的相关通路^[24]。

3.GSDME 诱导的细胞焦亡与细胞凋亡的相互联系

既往认为细胞凋亡和坏死是细胞死亡的两种主要形式^[25]，随着研究的深入，近几年来发现越来越多的细胞死亡形式，如细胞焦亡^[26]、细胞自噬^[27]、中性粒细胞外捕网性死亡^[28]和铁死亡^[29]等。

细胞凋亡主要在单个细胞上且通常在没有炎症反应的情况下发生。细胞凋亡包括外源性途径和内源性途径。内源性途径由 DNA 损伤、病毒感染、糖皮质激素和缺氧等刺激引起的内源性应激激活，导致 Bax/Bak 介导线粒体外膜上形成孔，从而释放促凋亡蛋白如细胞色素 C (Cyto c)、HtrA2/Omi 到胞浆中。胞浆中的 Cyto c 与凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 结合，导致 Caspase-9 前体的募集并激活，活化的 caspase-9 随后剪切 caspase-3/7 前体，最终导致细胞凋亡。外源性途径是由死亡受体介导的，当 TNF- α 等配体与死亡受体结合后，caspase-8 被募集并激活，活化的 caspase-8 同样可以剪切 caspase-3 前体以介导细胞凋亡^[26]。

细胞凋亡是一个伴随着细胞萎缩的死亡过程，它导致细胞体积减小和细胞质致密^[30]。而焦亡的形态学特征是在细胞膜上形成孔，细胞肿胀继而细胞破裂，释放促炎因子和细胞内容物，并在光学显微镜下细胞体积增大^[2, 31]。

2013 年就有研究发现，细胞焦亡与凋亡可以具有同样的激活条件，而焦亡具有较高的激活阈值，并 DNA 损伤程度较高时占主导地位，发生得较细胞凋亡更快^[32]。Caspase-3/GSDME 焦亡通路改变了 caspase-3 的激活只会导致细胞凋亡的传统理论，它们将细胞凋亡和细胞焦亡连接起来。2017 年首次证明 DFNA5 (GSDME) 是调控凋亡细胞转变为细胞焦亡的中心分子，在这之前的一些研究发现如果凋亡细胞没有被清除，它们就会进入被称为继发性坏死的溶解和炎症期，这篇研究及后续的研究证明这种被称为继发性坏死的死亡形式似乎是细胞焦亡，在这个研究中，他们发现表达 DFNA5 的细胞，在凋亡触发条件刺激下，进展为继发性坏死（细胞焦亡），但在 DFNA5 缺失时分解成小的凋亡小体^[16]。经典的线粒体途径凋亡（内源性途径），Bax/Cyto c/APAF1/ caspase 轴，也在 GSDME 介导的细胞焦亡起着重要作用^[33]。雷公藤内酯 (TPL) 处理导致 BAD/BAX-caspase-3 级联活化，激活 caspase-3 裂解 GSDME 诱导焦亡作用来清除头颈部癌细胞，沉默 GSDME 可减弱 TPL 对癌细胞的细胞毒性^[34]。3', 5'-二戊基化查尔酮(C10)通过 PKC δ /JNK/Bax/Cyt c/caspase-3 通路

活化 GSDME, 引起前列腺癌细胞 PC3 发生焦亡, 并释放 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等炎症因子^[35]。大气压冷等离子体通过 ROS/JNK/Bax/Cyto c/caspase 级联活化, 剪切 GSDME, 引起高表达 GSDME 的肿瘤细胞发生焦亡^[36]。Caspase-3 通过 Apaf-1 与 GSDME 相关, 导致化疗患者发生细胞焦亡^[37]。

此外, GSDME 不仅可以介导焦亡, 同时也可以增强细胞内在凋亡途径^[17, 38]。除了靶向细胞膜外, GSDME 的 N 端也可靶向线粒体。Van Rossom, S.等人在酿酒酵母中引入了野生型和突变型的 DFNA5 等位基因, 他们发现, 与野生型相比, 突变型的酵母出现了明显的生长缺陷, 同时显示出显著增加的 ROS 水平和细胞程序性死亡的迹象, 这在一定程度上归因于其与线粒体的相互作用^[39]。GSDME 的 N 端靶向线粒体, 促进细胞色素 C 释放, 增强 caspase-3/7 激活和细胞凋亡, 而增强的活性 caspase-3 又会进一步剪切 GSDME, 而且其导致线粒体膜通透性改变可能要早于引起胞膜的破裂。研究同时发现 GSDMD 及 GSDMA 的 N 端都可靶向线粒体, 释放细胞色素 C, 进而增强凋亡途径^[17]。通过基因表达微阵列实验, 证明 GSDME 敲除的小鼠凋亡通路受到抑制^[24]。在 GSDME 转染后, 调节不同凋亡通路的基因上调, 包括氧化应激、线粒体功能障碍、戊糖磷酸途径激活、内质网应激和 MAPK 信号^[39-42]。GSDME 还可作为凋亡的内源性途径和外源性途径的连接分子, 外源性途径通过 caspase-3 剪切 GSDME 后, 其剪切体通过增加线粒体膜的通透性而放大内源性通路信号。

在细胞焦亡和细胞凋亡间, caspase-3/GSDME 将两种细胞死亡形式相连接, 这两种细胞死亡形式有着共同的上游信号, 又在 caspase-3 处出现了分叉点。GSDME 同样参与了细胞凋亡, caspase-3/GSDME 在其中形成了一个自我放大的正反馈环路, GSDME 还连接了内源性和外源性的凋亡途径。

4.GSDME 依赖的细胞焦亡与 GSDMD 依赖的细胞焦亡间相互联系

GSDME 被 caspase-3 剪切, 而 GSDMD 被 caspase-1/4/5/11 所活化。炎症性 caspase-1/4/5/11, 凋亡启动者 caspase-8/9 和凋亡执行者 caspase-7 都不能直接剪切 GSDME 使其产生 GSDME-N 结构域^[43, 44]。因此, 过去常认为 GSDMD 及 GSDME 各自功能独立。

在 GSDMD 焦亡通路某一环节被阻断后, GSDME 焦亡通路似乎作为补偿通路促进细胞焦亡。当 NLRP3 形成炎症小体的作用被阻断时, ATP 通过 caspase-3/GSDME 轴诱导巨噬细胞的焦亡^[45]。在 caspase-1/11 缺陷巨噬细胞激活 NLRP3 炎症小体, 可通过 ASC 介导的 caspase-8 激活和随后的 GSDME 剪切诱导细胞焦亡^[46]。

Caspase-1 在 GSDMD 表达量足够时诱导细胞焦亡,但在 GSDMD 缺乏时诱导细胞凋亡,caspase-1 诱导的凋亡涉及到 Bid/caspase-9/caspase-3 通路,随后可引起 GSDME 依赖的焦亡^[47]。无菌条件下,可通过蛋白复合物(Apaf-1/caspase-4 焦亡小体)的组装来激活 caspase-4,促进焦亡作用,与有菌环境下 LPS 激活 caspase-4 直接剪切 GSDMD 不同,Apaf-1 焦亡小体中激活的 caspase-4 会剪切 caspase-3,从而诱导 GSDME 焦亡^[48]。

GSDME 焦亡通路似乎对 GSDMD 焦亡通路具有拮抗作用,但两者又可能同时发生。在细胞凋亡过程中,caspase-3/-7 通过在与炎症性 caspase 的切割点不同位置(Asp87)切割 GSDMD,产生 p45 及 p13 片段,使其蛋白灭活,特异性地阻止了细胞的焦亡^[16, 49]。LPS 可通过 NLRP3/caspase-1/GSDMD 和 caspase-3/GSDME 两条信号通路同时诱导滑膜成纤维细胞发生焦亡促进类风湿性关节炎的发生,NF- κ B 信号通路作为这两条通路的上游,参与调控^[50]。

总的来说,GSDME 焦亡通路与 GSDMD 焦亡通路并不是相互独立的,两者通过 caspase 产生交叉相互联系,既互相补充又相互抑制,其调控机制十分复杂,还需要更多的研究来揭示其中关联。

5.GSDME 诱导的细胞焦亡在肿瘤方面的研究

早期研究中就发现了 GSDME 在癌症治疗中的潜在作用,最早在 2001 年 Lage, H.等发现 DFNA5 (GSDME) 的 mRNA 表达水平在依托泊苷耐药的黑色素瘤细胞中明显下降,而在稳定转染 GSDME 后,依托泊苷导致耐药黑色素瘤细胞 caspase-3 介导的细胞死亡事件增加,当时研究将该细胞死亡事件认为是细胞凋亡,这也是最早发现 GSDME 与细胞死亡有关的研究^[22]。随后,Masuda, Y.等人发现 DFNA5(GSDME) 在 p53 介导的依托泊苷诱导细胞死亡调控中发挥作用^[51],但未探究其机制。2017 年 Yupeng Wang 及其团队在 Nature 上发表的一篇文章发现,GSDME 可以将 TNF 或化疗药物诱导的 caspase-3 介导的凋亡转变为焦亡,GSDME 被 caspase-3 特异性切割,产生一个可在膜上穿孔的 GSDME-N 片段,从而诱导焦亡^[43],自此开始了一系列 GSDME 诱导的焦亡在肿瘤方面的研究。

5.1 GSDME 决定了癌细胞在治疗中能否发生焦亡

在一些药物治疗肿瘤的实验中,发现 GSDME 的参与与否决定了其诱导肿瘤细胞死亡形式是凋亡还是焦亡。Yan, L.等发现用三氯苯达唑治疗,可导致人乳腺癌细胞系(MCF-7 和 MDA-MB-231)发生 caspase-3/GSDME 依赖的细胞焦亡,同时也发现三氯苯达唑通过调节凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 以及增强 caspase-8/9/3/7 和 PARP 的

剪切而激活细胞凋亡^[52]，说明在某些表达 GSDME 的癌细胞系中，药物的治疗可同时诱导细胞凋亡及细胞焦亡。Zhang, X.等人的研究发现，丹参新酮诱导肝癌细胞系 HepG2 或 Hepa1-6 发生 caspase-3/GSDME 介导的细胞焦亡，并且敲除 GSDME 使其诱导的细胞死亡形式由焦亡转变为凋亡^[53]。异黄酮诱导食管鳞癌细胞发生细胞凋亡以及焦亡，通过敲除或抑制 GSDME 可以将细胞死亡的形式从焦亡转变为凋亡^[54]。同样，Wang, Y.等人用 CRISPR-Cas9 敲除 GSDME 后，发现 5-FU 诱导的胃癌细胞 SGC-7901 的焦亡转变为凋亡^[44]。

5.2 GSDME 的表达水平影响肿瘤对药物的敏感性

在表达 GSDME 的细胞中，药物可通过诱导 GSDME 依赖的细胞焦亡进行癌症治疗，且其表达水平与药物的治疗效果呈正相关，这意味着 GSDME 可能是未来预测某些药物治疗癌症预后的潜在生物标志物。而 Yang, X.等人发现大气压冷等离子体(CAP)在 GSDME 高表达的肿瘤细胞株中以剂量依赖的方式诱导焦亡，而 GSDME 的基础水平反映了癌细胞株对 CAP 的敏感性^[36]。GW4064 可通过诱导 BAX/caspase-3/GSDME 介导的细胞焦亡增强结肠癌细胞对奥沙利铂的化学敏感性^[55]。Peng, Z.等人用顺铂对四种表达不同水平 GSDME 的肺癌细胞进行处理，发现 GSDME 高表达细胞对顺铂治疗更敏感，在低表达 GSDME 的 H1299 细胞中过表达 GSDME 后，顺铂处理后，其凋亡转为焦亡^[56]。因为在大部分肿瘤细胞中 GSDME 基因高甲基化，影响 GSDME 蛋白表达^[57, 58]，Fan, J. X.等人将地西他滨(DAC)用于肿瘤细胞中 GSDME 基因的去甲基化，随后给予顺铂给药，在肿瘤细胞中实现了 GSDME 沉默的逆转，提高了化疗的治疗效果^[59]。

5.3 GSDME 在正常细胞中的表达可能与化疗的副作用相关

化疗后，在某些表达 GSDME 的癌细胞中可发生焦亡，而 GSDME 也在许多正常组织中表达，引起正常细胞焦亡而产生副作用。Wang, Y.等人发现 Gsdme^{-/-}小鼠免受化疗引起的组织损伤和体重下降^[43]。Shen, X.等发现化疗药物顺铂和多柔比星，诱导肾小管上皮细胞通过 ROS/JNK/caspase-3/GSDME 通路发生细胞焦亡，提示化疗药物可能通过 GSDME 焦亡通路引起的肾毒性^[60]。Huang, Z.等人发现口腔鳞状细胞癌患者的正常组织中，GSDME 的表达水平高于癌组织，是铂类化疗副作用的主要原因^[61]。Mai, F. Y.等通过体内及体外实验证明，顺铂和多柔比星化疗药物通过诱导 GSDME 介导的焦亡对巨噬细胞产生不良毒性，从而损害对感染的固有免疫^[62]。

5.4 药物可能通过氧化应激诱导 GSDME 依赖的焦亡治疗肿瘤

Liang, W. F.等人发现姜黄素通过增加细胞内 ROS 水平增加了 GSDME-N 端的

表达,促进了肝癌 HspG2 细胞系的焦亡而发挥抗癌作用^[63]。Zhou, B.等使用铁处理黑色素瘤细胞,铁激活的 ROS 可以通过 Tom20/Bax/caspase-3/GSDME 途径诱导焦亡^[64]。An, H.等人发现六氧化四砷通过抑制线粒体 STAT3 的磷酸化,增加线粒体 ROS 的产生,进而诱导 caspase-3 依赖性的 GSDME 剪切,从而促进三阴性乳腺癌 (TNBC)细胞的焦亡^[65]。目前许多研究发现 JNK 通路可能参与氧化应激刺激 GSDME 介导的细胞焦亡。Zhang, Z.等人发现了多柔比星 (DOX) 诱导两种人乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231 和 T47D)的细胞焦亡,并发现了 ROS/JNK/ caspase-3 信号通路参与其中^[66]。另一项类似研究也发现,三氯苯达唑增加了细胞内 ROS,通过 JNK/Bax/caspase-3 通路诱导人乳腺癌细胞发生 GSDME 依赖的细胞焦亡^[52]。CAP 诱导的 ROS 生成启动了高表达 GSDME 癌细胞株的焦亡信号,而 CAP 诱导的焦亡依赖于线粒体通路(JNK/cytochrome c/caspase-9/caspase-3)的激活和 GSDME 的裂解^[36]。Yu, J.等发现在结肠癌细胞 HT-29 和 HCT116 cells 中,洛铂通过 ROS/JNK/ bax 线粒体途径凋亡通路激活 caspase-3/9,进而引起 GSDME 介导的焦亡^[67]。

但是 JNK/caspase-3 通路并不是氧化应激参与 GSDME 诱导细胞焦亡唯一通路,Chen, Z.等研究发现洛铂通过激活 caspase-3 引起 GSDME 介导的鼻咽癌细胞焦亡,其机制可能与洛铂诱导细胞凋亡抑制蛋白-1/2 (cIAP1/2)的蛋白酶体降解有关,并且 RIP 蛋白凋亡体 (RIPK1/Caspase-8/FADD)及 ROS 参与其中,且不依赖 JNK 和 NF- κ B 信号的磷酸化^[68]。Chen, S.等人发现山奈酚提高 ROS,降低胶质瘤细胞线粒体膜电位,诱导自噬,并最终触发胶质瘤细胞的焦亡,当使用 3-MA 抑制自噬时,发现 GSDME 剪切减少了,这表明山奈酚通过调节胶质瘤细胞的自噬来诱导焦亡^[69]。

GSDME 不单单通过诱导癌细胞发生焦亡进行治疗。Peng, Z.等人发现顺铂在非小细胞肺癌治疗中,其诱导的 GSDME 的焦亡作用通过释放趋化因子招募 T 细胞聚集到肿瘤组织中,发挥免疫功能^[56]。Shangguan, F.等人在一篇发表在 Nature 上的研究发现 GSDME 的表达增强了肿瘤相关巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用,以及肿瘤浸润的自然杀伤细胞和 CD8+ T 淋巴细胞的数量和功能。杀伤细胞释放的颗粒酶 B 在与 caspase 3 相同位点直接剪切 GSDME 来激活靶细胞中不依赖 caspase-3 的焦亡^[70]。

总的来说,药物诱导 GSDME 依赖的细胞焦亡,从而抑制恶性肿瘤,可以为各种癌症带来新的治疗选择。一些潜在的诱导 GSDME 的药物可作为癌症治疗的候选药物,而抑制 GSDME 的药物也可作为靶向预防癌症治疗副作用的药物进一步研究,

6. 总结

目前, 在多种疾病的研究中, 细胞焦亡所引起的细胞死亡已经引起了研究人员的广泛关注。准确阐明疾病或病理状态下, 焦亡调节的细胞死亡的形态学和分子机制有助于揭示其病理生理学, 并在未来对这类疾病的治疗和管理提供了新的着手点。但是不同于 GSDMD, GSDME 诱导细胞焦亡的作用研究才刚刚开始, 而且多集中于癌症方向。而凋亡分子 caspase-3 新发现的剪切 GSDME 的功能, 又将传统凋亡通路与焦亡通路连接起来, 这一关联网络也有待完善与丰富, 围绕在 caspase-3/GSDME 通路的相关研究还是十分具有研究前景的。

参考文献

- [1] De Beeck K O, Van Laer L, Van Camp G. DFNA5, a gene involved in hearing loss and cancer: a review[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2012, 121 (3): 197-207.
- [2] Zychlinsky A, Prevost M C, Sansonetti P J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages[J]. *Nature*, 1992, 358 (6382): 167-9.
- [3] Al Mamun A, Mimi A A, Aziz M A, et al. Role of pyroptosis in cancer and its therapeutic regulation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021: 174444.
- [4] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 128.
- [5] Zheng Z, Deng W, Lou X, et al. Gasdermins: pore-forming activities and beyond[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2020, 52 (5): 467-474.
- [6] Feng S, Fox D, Man S M. Mechanisms of Gasdermin Family Members in Inflammasome Signaling and Cell Death[J]. *J Mol Biol*, 2018, 430 (18 Pt B): 3068-3080.
- [7] Wang L, Qin X, Liang J, et al. Induction of Pyroptosis: A Promising Strategy for Cancer Treatment[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 635774.
- [8] Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 211.
- [9] Compan V, Martín-Sánchez F, Baroja-Mazo A, et al. Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD forms specks but does not activate caspase-1 in the absence of NLRP3 during macrophage swelling[J]. *J Immunol*, 2015, 194 (3): 1261-73.
- [10] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526 (7575): 660-5.

- [11] Antonopoulos C, Russo H M, El Sanadi C, et al.Caspase-8 as an Effector and Regulator of NLRP3 Inflammasome Signaling[J].J Biol Chem,2015, 290 (33): 20167-84.
- [12] Kayagaki N, Stowe I B, Lee B L, et al.Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J].Nature,2015, 526 (7575): 666-71.
- [13] Schmid-Burgk J L, Gaidt M M, Schmidt T, et al.Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells[J].Eur J Immunol,2015, 45 (10): 2911-7.
- [14] Lieberman J, Wu H, Kagan J C.Gasdermin D activity in inflammation and host defense[J].Sci Immunol,2019, 4 (39).
- [15] Wang M, Chen X, Zhang Y.Biological Functions of Gasdermins in Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential[J].Front Cell Dev Biol,2021, 9: 638710.
- [16] 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.
- [17] Rogers C, Erkes D A, Nardone A, et al.Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation[J].Nat Commun,2019, 10 (1): 1689.
- [18] Jiang S, Gu H, Zhao Y, et al.Teleost Gasdermin E Is Cleaved by Caspase 1, 3, and 7 and Induces Pyroptosis[J].J Immunol,2019, 203 (5): 1369-1382.
- [19] De Schutter E, Roelandt R, Riquet F B, et al.Punching Holes in Cellular Membranes: Biology and Evolution of Gasdermins[J].Trends Cell Biol,2021, 31 (6): 500-513.
- [20] Kovacs S B, Miao E A.Gasdermins: Effectors of Pyroptosis[J].Trends Cell Biol,2017, 27 (9): 673-684.
- [21] De Schutter E, Croes L, Ibrahim J, et al.GSDME and its role in cancer: From behind the scenes to the front of the stage[J].Int J Cancer,2021, 148 (12): 2872-2883.
- [22] Lage H, Helmbach H, Grottko C, et al.DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells[J].FEBS Lett,2001, 494 (1-2): 54-9.
- [23] Webb M S, Miller A L, Thompson E B.In CEM cells the autosomal deafness gene dfna5 is regulated by glucocorticoids and forskolin[J].J Steroid Biochem Mol Biol,2007, 107 (1-2): 15-21.
- [24] Op De Beeck K, Van Camp G, Thys S, et al.The DFNA5 gene, responsible for hearing loss and involved in cancer, encodes a novel apoptosis-inducing protein[J].Eur J Hum Genet,2011, 19 (9):

- 965-73.
- [25] Wang Q, Wu J, Zeng Y, et al. Pyroptosis: A pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 510: 62-72.
- [26] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25 (3): 486-541.
- [27] Lamb C A, Yoshimori T, Tooze S A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14 (12): 759-74.
- [28] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1532-5.
- [29] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149 (5): 1060-72.
- [30] Wang Y, Peng J, Xie X, et al. Gasdermin E-mediated programmed cell death: An unpaved path to tumor suppression[J]. *J Cancer*, 2021, 12 (17): 5241-5248.
- [31] He W T, Wan H, Hu L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J]. *Cell Res*, 2015, 25 (12): 1285-98.
- [32] Sagulenko V, Thygesen S J, Sester D P, et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20 (9): 1149-60.
- [33] Lu H, Zhang S, Wu J, et al. Molecular Targeted Therapies Elicit Concurrent Apoptotic and GSDME-Dependent Pyroptotic Tumor Cell Death[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24 (23): 6066-6077.
- [34] Cai J, Yi M, Tan Y, et al. Natural product triptolide induces GSDME-mediated pyroptosis in head and neck cancer through suppressing mitochondrial hexokinase-II[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40 (1): 190.
- [35] Zhang Y, Yang J, Wen Z, et al. A novel 3',5'-diprenylated chalcone induces concurrent apoptosis and GSDME-dependent pyroptosis through activating PKC δ /JNK signal in prostate cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (10): 9103-9124.
- [36] Yang X, Chen G, Yu K N, et al. Cold atmospheric plasma induces GSDME-dependent pyroptotic signaling pathway via ROS generation in tumor cells[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (4): 295.
- [37] Tsuchiya K. Switching from Apoptosis to Pyroptosis: Gasdermin-Elicited Inflammation and Antitumor Immunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (1).
- [38] Zheng Z, Li G. Mechanisms and Therapeutic Regulation of Pyroptosis in Inflammatory Diseases and Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (4).

- [39] Van Rossom S, Op De Beeck K, Franssens V, et al. The splicing mutant of the human tumor suppressor protein DFNA5 induces programmed cell death when expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 77.
- [40] Van Rossom S, Op De Beeck K, Hristovska V, et al. The deafness gene DFNA5 induces programmed cell death through mitochondria and MAPK-related pathways[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 231.
- [41] Gregan J, Van Laer L, Lieto L D, et al. A yeast model for the study of human DFNA5, a gene mutated in nonsyndromic hearing impairment[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1638 (2): 179-86.
- [42] Van Laer L, Vrijens K, Thys S, et al. DFNA5: hearing impairment exon instead of hearing impairment gene?[J]. *J Med Genet*, 2004, 41 (6): 401-6.
- [43] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. *Nature*, 2017, 547 (7661): 99-103.
- [44] Wang Y, Yin B, Li D, et al. GSDME mediates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495 (1): 1418-1425.
- [45] Zeng C Y, Li C G, Shu J X, et al. ATP induces caspase-3/gasdermin E-mediated pyroptosis in NLRP3 pathway-blocked murine macrophages[J]. *Apoptosis*, 2019, 24 (9-10): 703-717.
- [46] Aizawa E, Karasawa T, Watanabe S, et al. GSDME-Dependent Incomplete Pyroptosis Permits Selective IL-1 α Release under Caspase-1 Inhibition[J]. *iScience*, 2020, 23 (5): 101070.
- [47] Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, et al. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D[J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 2091.
- [48] Xu W, Che Y, Zhang Q, et al. Apaf-1 Pyroptosome Senses Mitochondrial Permeability Transition[J]. *Cell Metab*, 2021, 33 (2): 424-436.e10.
- [49] Taabazuing C Y, Okondo M C, Bachovchin D A. Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages[J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24 (4): 507-514.e4.
- [50] Yang P, Feng W, Li C, et al. LPS induces fibroblast-like synoviocytes RSC-364 cells to pyroptosis through NF- κ B mediated dual signalling pathway[J]. *J Mol Histol*, 2021, 52 (4): 661-669.
- [51] Masuda Y, Futamura M, Kamino H, et al. The potential role of DFNA5, a hearing impairment gene, in p53-mediated cellular response to DNA damage[J]. *J Hum Genet*, 2006, 51 (8): 652-664.
- [52] Yan L, Liu Y, Ma X F, et al. Triclabendazole Induces Pyroptosis by Activating Caspase-3 to Cleave GSDME in Breast Cancer Cells[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 670081.

- [53] Zhang X, Zhang P, An L, et al. Miltirone induces cell death in hepatocellular carcinoma cell through GSDME-dependent pyroptosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10 (8): 1397-1413.
- [54] Zhang B, Zhu W Y, Tian H, et al. Alpinumisoflavone triggers GSDME-dependent pyroptosis in esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2021, 304 (2): 323-332.
- [55] Guo J, Zheng J, Mu M, et al. GW4064 enhances the chemosensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin by inducing pyroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 548: 60-66.
- [56] Peng Z, Wang P, Song W, et al. GSDME enhances Cisplatin sensitivity to regress non-small cell lung carcinoma by mediating pyroptosis to trigger antitumor immunocyte infiltration[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5 (1): 159.
- [57] Yokomizo K, Harada Y, Kijima K, et al. Methylation of the DNMT3A gene is frequently detected in colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32 (4): 1319-22.
- [58] Fujikane T, Nishikawa N, Toyota M, et al. Genomic screening for genes upregulated by demethylation revealed novel targets of epigenetic silencing in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122 (3): 699-710.
- [59] Fan J X, Deng R H, Wang H, et al. Epigenetics-Based Tumor Cells Pyroptosis for Enhancing the Immunological Effect of Chemotherapeutic Nanocarriers[J]. *Nano Lett*, 2019, 19 (11): 8049-8058.
- [60] Shen X, Wang H, Weng C, et al. Caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis contributes to chemotherapy drug-induced nephrotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 186.
- [61] Huang Z, Zhang Q, Wang Y, et al. Inhibition of caspase-3-mediated GSDME-derived pyroptosis aids in noncancerous tissue protection of squamous cell carcinoma patients during cisplatin-based chemotherapy[J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10 (12): 4287-4307.
- [62] Mai F Y, He P, Ye J Z, et al. Caspase-3-mediated GSDME activation contributes to cisplatin- and doxorubicin-induced secondary necrosis in mouse macrophages[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52 (5): e12663.
- [63] Liang W F, Gong Y X, Li H F, et al. Curcumin Activates ROS Signaling to Promote Pyroptosis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells[J]. *In Vivo*, 2021, 35 (1): 249-257.
- [64] Zhou B, Zhang J Y, Liu X S, et al. Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis[J]. *Cell Res*, 2018, 28 (12): 1171-1185.
- [65] An H, Heo J S, Kim P, et al. Tetraarsenic hexoxide enhances generation of mitochondrial ROS to promote pyroptosis by inducing the activation of caspase-3/GSDME in triple-negative breast cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 159.

- [66] Zhang Z, Zhang H, Li D, et al. Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2021.
- [67] Yu J, Li S, Qi J, et al. Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (3): 193.
- [68] Chen Z, Xu G, Wu D, et al. Lobaplatin induces pyroptosis through regulating cIAP1/2, Ripoptosome and ROS in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177: 114023.
- [69] Chen S, Ma J, Yang L, et al. Anti-glioblastoma Activity of Kaempferol via Programmed Cell Death Induction: Involvement of Autophagy and Pyroptosis[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 614419.
- [70] Zhang Z, Zhang Y, Xia S, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2020, 579 (7799): 415-420.