

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.005

· 基础研究 ·

鼻咽癌组织中高表达的GSDME对TME免疫浸润和患者预后的影响

丁一^a, 李昆芳^{a△}, 王然^a, 张隽宁^a, 苑珀湏^a, 毕馨曼^a, 余继霜^a, 屈艳琳^b(济宁医学院 a. 基础医学院; b. 形态学实验室, 山东 济宁 272067)

[摘要] **目的:** 探究细胞焦亡相关基因GSDME在鼻咽癌组织中的表达及其对肿瘤微环境(TME)和患者预后的影响。**方法:** 从TCGA数据库获得548例鼻咽癌患者的基因表达数据及临床资料, 运用R语言对GSDME进行差异表达分析、GO-KEGG富集分析; 从人类蛋白质图谱(HPA)数据库中获取GSDME蛋白在鼻咽癌组织和相应癌旁组织中的表达数据, 通过STRING数据库探究与GSDME相互作用的蛋白质网络; 应用ssGSEA算法分析GSDME在鼻咽癌组织中的表达及其与24种免疫细胞浸润的相关性, 运用Spearman法分析GSDME与免疫检查点分子的相关性, 通过TISIDB数据库分析GSDME表达与细胞因子基因表达的相关性。单因素和多因素COX回归分析筛选预后风险因素, 基于风险因素GSDME绘制预后预测列线图和校准图, 根据GSDME的表达水平对鼻咽癌患者进行生存分析和风险分析。qPCR法验证中国人鼻咽癌组织中GSDME及4种趋化因子mRNA的表达。**结果:** 数据库数据分析显示, 与癌旁组织相比, 鼻咽癌组织中GSDME呈高表达($P<0.01$), GO-KEGG富集分析显示GSDME参与免疫反应、细胞焦亡相关信号通路, GSDME表达与免疫细胞浸润、细胞因子及免疫检查点分子表达等相关, qPCR检查结果验证了中国人鼻咽癌组织中GSDME呈高表达。GSDME表达量、N分期和M分期是鼻咽癌患者预后的风险因素, 基于风险因素建立的列线图和校正图能较好地预测鼻咽癌患者OS, 鼻咽癌组织中GSDME高表达的患者预后差。**结论:** GSDME在鼻咽癌组织中呈高表达且是患者预后风险因素, 基于GSDME建立的列线图预测预后效能良好; GSDME高表达与TME免疫浸润有关, 其可能是免疫治疗的潜在靶点。

[关键词] 鼻咽癌; 细胞焦亡; GSDME; 预后; 免疫细胞浸润

[中图分类号] R737.11; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)06-0489-08

Effect of high expression of GSDME in nasopharyngeal carcinoma tissues on immune infiltration of tumor microenvironment and patient prognosis

DING Yi^a, LI Kunfang^{a△}, WANG Ran^a, ZHANG Juanning^a, YUAN Poyun^a, BI Xinman^a, YU Jishuang^a, QU Yanlin^b (a. School of Basic Medicine; b. Laboratory of Morphology, Jining Medical College, Jining 272067, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of pyroptosis related gene GSDME on the prognosis of patients with nasopharyngeal carcinoma and its interaction with the immune microenvironment. **Methods:** Gene expression profile and clinical data of 548 patients with nasopharyngeal carcinoma were obtained from TCGA database. Differential expression analysis and GO-KEGG enrichment analysis of GSDME were conducted using R language. Immunohistochemical maps of GSDME protein in nasopharyngeal carcinoma tissues and corresponding para-carcinoma tissues were obtained from The Human Protein Atlas database. The interacting proteins of GSDME were explored by using STRING database. The correlation between GSDME expression and infiltration of 24 kinds of immune cells in nasopharyngeal carcinoma tissues was analyzed by ssGSEA algorithm, the correlation between GSDME expression and immune checkpoint molecules was analyzed by Spearman method, and the correlation between GSDME expression and cytokine expression was analyzed by using TISIDB database. Univariate and multivariate COX regression analyses were used to screen the risk factors for prognosis, based on which, the nomogram and calibration curve were drawn. Survival analysis and risk analysis were performed in nasopharyngeal carcinoma patients based on GSDME expression levels. The mRNA expression of GSDME and four chemokines in Chinese nasopharyngeal carcinoma tissues was verified by qPCR. **Results:** Analysis of database data showed that GSDME was highly expressed in nasopharyngeal carcinoma tissues compared with paraneoplastic tissues ($P<0.01$), GO-KEGG enrichment analysis showed that GSDME was involved in immune response, cell pyroptosis-related signaling pathways, and GSDME expression was correlated with immune cell infiltration, cytokine and immune checkpoint molecule expression. qPCR examination of Chinese nasopharyngeal carcinoma tissues verified the bioinformatics predictions; GSDME expression, N stage and M stage were risk

[基金项目] 山东省重点研发计划项目(No:2018GSF118137); 济宁医学院2022年省级大学生创新训练计划项目(No.s202210443007); 2023 济宁医学院大学生创新训练计划项目(No.cx2023081z)

[作者简介] 丁一(2002—), 女, 本科在读, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究, E-mail: 970092271@qq.com; 李昆芳(2001—), 女, 本科在读, 主要从事肿瘤免疫学方面的研究, E-mail: 1905369271@qq.com。△为共同第一作者

[通信作者] 屈艳琳, E-mail: 2753167672@qq.com

factors for the prognosis of nasopharyngeal carcinoma patients, and the nomogram and calibration curve based on risk factors could better predict the OS of nasopharyngeal carcinoma patients, and patients with high GSDME expression in nasopharyngeal carcinoma tissues had poor prognosis. **Conclusion:** GSDME is highly expressed in nasopharyngeal carcinoma tissues and is associated with patient's poor prognosis. High GSDME expression is associated with the pro-cancer effect of the immune microenvironment in nasopharyngeal carcinoma, which may be a potential target for immunotherapy.

[Key words] nasopharyngeal carcinoma; pyroptosis; GSDME; prognosis; immune cell infiltration

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(6): 489-496. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.06.005]

鼻咽癌是一种头颈部常见肿瘤,其发病与遗传易感性、环境因素、EB病毒感染等因素密切相关^[1]。因其独特的解剖学位置和非特异性临床表现,难以在早期被诊断,高达80%的患者在晚期才被诊断,其预后极差^[2-3]。由于鼻咽癌进展到晚期,极易发生扩散和转移,患者的5年OS率约41%^[4-5],严重影响患者的生活质量。因为鼻咽癌起源于鼻咽部的三级淋巴结构,所以其癌组织中的免疫细胞浸润非常明显。免疫微环境中主要为免疫抑制细胞,包括髓源性抑制细胞(MDSC)、Treg细胞、M2型Mφ等,其中MDSC约占50%,主要发挥免疫抑制作用和促进肿瘤血管形成^[4-5]。相关研究^[6]表明,可通过免疫微环境的相关特征预测鼻咽癌患者的免疫治疗效果及生存情况。细胞焦亡是一种依赖炎症小体的程序性细胞死亡方式,在机体中发挥双重性的作用。正常生理情况下,细胞焦亡蛋白通过参与免疫反应以保护机体防御病原体感染;随着反应的加剧,大规模的细胞死亡使正常组织遭到损伤,引发机体过度炎症、自身免疫系统遭到攻击等现象,在多个阶段影响着肿瘤发生发展^[7-8]。GSDME基因属于gasdermin(GSDM)家族,GSDME蛋白作为细胞焦亡的重要参与者,其临床预后价值已在多种癌症中被证实。FU等^[9]研究肝癌时发现,高风险组患者GSDME的表达水平高于低风险组,其预后更差。一项胃癌研究^[10]也表明,高表达GSDME预示患者更低的OS。但相关肺癌研究结果却显示,高表达GSDME可延长晚期患者术后的生存时间,其可作为抑癌因子发挥作用^[11]。近来,癌症患者体内的免疫微环境受到广泛关注,其复杂性、多样性影响了癌症发生发展及患者预后,为临床免疫治疗提供了新思路^[12]。本研究基于TCGA数据库,利用生物信息学方法从分子功能、临床预后、免疫微环境等方面,探究GSDME在鼻咽癌中的潜在预后评估价值及其与免疫细胞浸润的关系,希望能协助临床医生进行鼻咽癌的早期风险评估和及时治疗干预,以改善患者的预后。

1 材料与方法

1.1 利用数据库分析GSDME基因在鼻咽癌组织和癌旁组织中的表达差异

利用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)公开数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)采

集548例鼻咽癌患者完整的转录组、临床信息等数据,运用t检验对配对鼻咽癌组织和对应癌旁组织中GSDME mRNA表达进行分析。利用人类蛋白质图谱(The Human Protein Atlas, HPA)数据库数据(<https://www.proteinatlas.org>)获得鼻咽癌组织和癌旁组织中GSDME蛋白的表达情况。

1.2 利用数据库分析鼻咽癌组织中GSDME相关差异表达基因的功能

进行GSDME的功能富集分析时,以校正后 $P < 0.05$ 和 $|\log_2\text{-fold change(FC)}| > 1.5$ 为筛选标准,获得鼻咽癌组织中与GSDME相关的差异表达基因,再运用R语言将基因ID转化和GO-KEGG富集分析。GO分析包括生物过程、细胞成分、分子功能三部分,KEGG分析主要反映相关信号通路,运用Ggplot2软件包可视化处理(校正后 $P < 0.05$),获取排名前列的富集分析结果。STRING数据库(<https://cn.string-db.org/cgi/>)分析与GSDME相互作用的蛋白质,最小作用得分设置为0.4,展现相互作用的蛋白数目不超过20个。

1.3 利用数据库分析GSDME表达与鼻咽癌组织中免疫细胞浸润、免疫检查点分子和细胞因子的关系

应用R语言中的ssGSEA算法对鼻咽癌组织中GSDME表达与24种免疫细胞浸润情况进行Spearman相关性分析,其中相关系数满足“ $-1 < r < 0$ ”为负相关关系,“ $0 < r < 1$ ”为正相关关系,“ $r = 0$ ”为无相关关系^[13]。为探究GSDME与免疫检查点相关分子的关系,利用GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)搜索免疫检查点分子,获取相关基因后进行相关性分析。TISIDB(<http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php>)是一个提供肿瘤细胞和免疫系统相互作用的数据库,通过它分析GSDME与趋化因子、白细胞介素的相关性。

1.4 qPCR法验证GSDME相关差异表达基因在中国人鼻咽癌组织中的表达

将2023年2月至2023年4月间在济宁市第一人民医院耳鼻喉头颈外科手术切除的3例鼻咽癌组织及相应的癌旁组织置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。本研究方案经济宁市第一人民医院医院伦理委员会审批通过(No.JNMC-2023-YX-037),所有患者均同意并签署了知情同意书。每配对组中分别切取20 mg鼻咽癌

组织作为实验组 1、2、3; 20 mg 癌旁组织作为对照组 1、2、3。利用总 RNA 提取试剂盒(天根科技生化有限公司)分别提取 6 个组织块中的总 RNA, 紫外分光光度计检测其 RNA 浓度及纯度, 利用反转录试剂盒(天根科技生化有限公司)将总 RNA 反转录成 cDNA。

用 SYBR Green 试剂进行 qPCR, 其参数为: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s, 循环数为 40。以 GAPDH 作为内参照基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。qPCR 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 的引物序列

基因名称	正向引物(5'~3')	反向引物(5'~3')
GSDME	GTGCTGGAAGGAAGGAATGAGGTC	CCACGATGCCACCACACTTCTC
CXCL1	AACCGAAGTCATAGCCACACTCAAG	TTCCTCCTCCCTTCTGGTCAGTTG
CXCL2	AACCGAAGTCATAGCCACACTCAAG	TCCTCCTTCCTTCTGGTCAGTTGG
XCL3	AACCGAAGTCATAGCCACACTCAAG	CAGTTGGTGCTCCCCTTGTTTCAG
CXCL14	GCACTGCGAGGAGAAGATGGTTATC	TTCCAGGCGTTGTACCACTTGATG
GAPDH	CACCCACTCCTCCACCTTTGAC	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

1.5 统计学处理

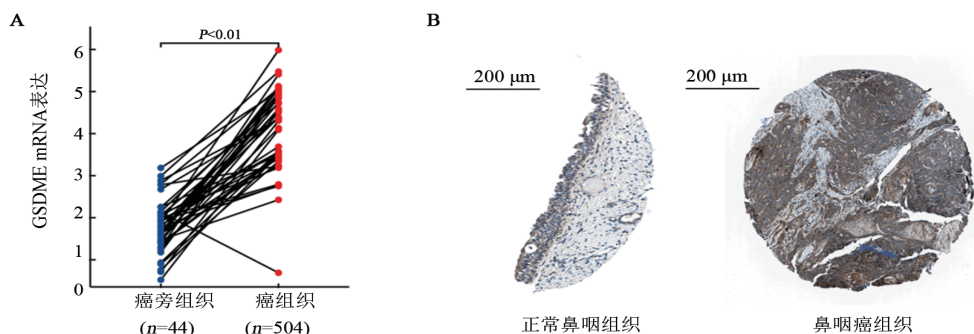
采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。各项实验均独立重复 3 次。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多种间比较采用单因素和多因素 COX 回归分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 数据库分析结果显示鼻咽癌组织中 GSDME 呈

高表达

利用 TCGA 数据库中数据分析结果(图 1A)表明, 与癌旁组织比较, 鼻咽癌组织中 GSDME mRNA 呈高表达($P < 0.01$)。利用 HPA 数据库分析 GSDME 在癌旁组织和鼻咽癌组织中的差异表达, 免疫组化检测结果(图 1B)显示, 癌旁组织着色较浅, 而鼻咽癌组织着色很强, 说明 GSDME 蛋白在鼻咽癌组织中也呈过表达。



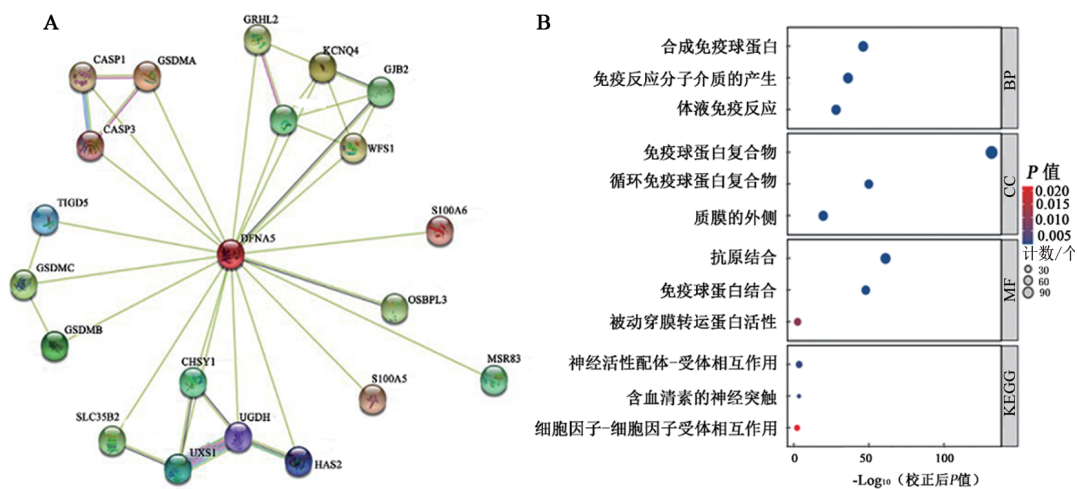
A: 基于 TCGA 数据库分析 GSDME mRNA 在癌旁和癌组织中的表达分析;
B: HPA 数据库中 GSDME 蛋白在鼻咽癌组织和癌旁组织中的免疫组化分析。

图 1 GSDME 基因在鼻咽癌组织和相应癌旁组织中的差异表达分析

2.2 数据库分析显示 GSDME 与神经活性配体/受体和细胞因子等通路有关

通过 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)分析 GSDME 蛋白与其他蛋白质的相互作用, 该网络关系图显示了 GSDME 蛋白可能与 CASP1、CASP3、GSDMA、GSDMB、GSDMC、GJB2、KCNQ4、OSBPL3、WFS1 等 20 种蛋白质发生相互作用(图 2A)。其中 CASP3 蛋白主要参与细胞凋亡过程^[4], 其他蛋白为钙结合蛋白、半胱天冬酶、磷酸肌醇结合蛋

白等, 参与了神经兴奋调节、细胞钙信号转导、细胞黏附等生物过程。为了进一步了解 GSDME 蛋白的功能, 进行 GO-KEGG 富集分析(图 2B)。GO 分析结果表明, GSDME 主要参与合成免疫球蛋白、体液免疫反应等生物过程, 主要在细胞质膜外侧与免疫球蛋白复合物相互作用, 具有和抗原、免疫复合物结合、被动穿膜转运蛋白等分子功能; KEGG 分析结果显示, GSDME 与神经活性配体与受体作用、细胞因子与其相互作用等通路有关。



A: GSDME 与其他蛋白质相互作用的网络; B: GSDME 与其他蛋白质相互作用的 GO-KEGG 富集分析。

图2 GSDME 与其他蛋白质相互作用的功能富集分析

2.3 GSDME 在鼻咽癌组织中的表达与免疫细胞浸润、免疫检查点分子及细胞因子的表达相关

GSDME 的功能分析显示其与细胞焦亡、相关免疫反应及免疫分子存在密切联系,因此有必要进一步探究其对鼻咽癌组织中免疫细胞浸润的影响。首先分析了 GSDME 在鼻咽癌组织的表达与 24 种免疫细胞浸润的相关情况,其中 GSDME 表达与 $T\gamma\delta$ 细胞、Th1 细胞、中性粒细胞等细胞的浸润呈正相关关系,与 B 细胞、杀伤性 T 细胞、 $CD8^+$ T 细胞的浸润呈负相关关系(图 3)。

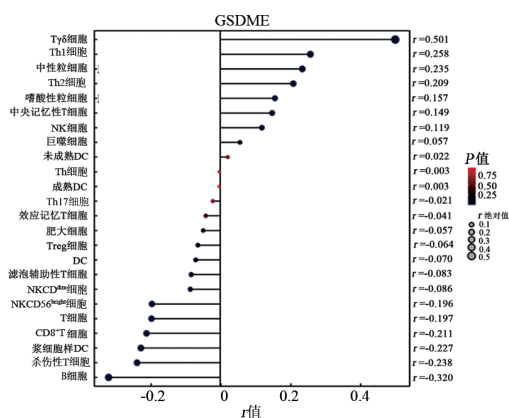


图3 鼻咽癌组织中 GSDME 表达与免疫细胞浸润的相关分析

目前应用于临床的免疫疗法多为免疫检查点抑制剂,如抗 PD-L1、抗 CTLA-4 单克隆抗体。在 GeneCards 数据库中获取免疫检查点基因,对得分较高的基因进行相关性分析。鼻咽癌中 CD276、STAT1 的表达均与 GSDME 的表达正相关(图 4),即 GSDME 表达量越高,免疫检查点相关分子的表达也相应升高。TISIDB 数据库提供了鼻咽癌组织中免疫激活分子和趋化因子的表达情况。相关性热图显示鼻咽癌中 CD27、CD28、CXCR4 等分子表达被抑制,而 CD276、IL-6 等分子的表达相对上调。另外, CXCL1、

CXCL2、CXCL3、CXCL14 等大多数趋化因子表达量增加(图 5)。

2.4 qPCR 检查结果验证了鼻咽癌组织中 GSDME mRNA 与多个趋化因子 mRNA 均呈高表达

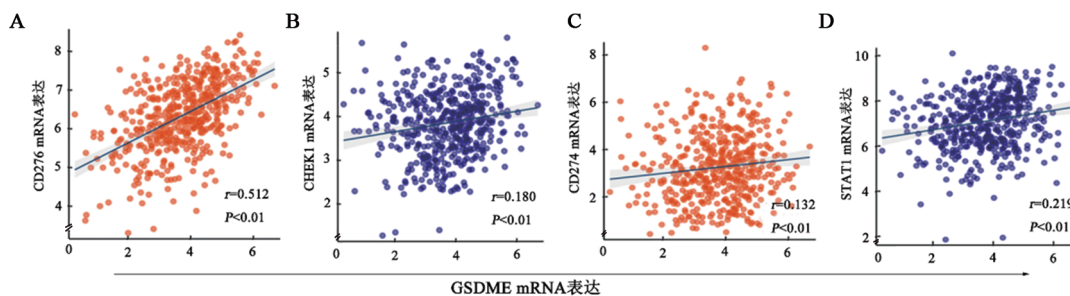
与癌旁组织比较,在鼻咽癌组织中 GSDME、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL14 mRNA 呈明显高表达(图 6, $P < 0.01$)。此结果验证了之前的生物信息学预测结果。

2.5 GSDME 表达量、N 分期和 M 分期为鼻咽癌患者预后的风险因素

将数据库中鼻咽癌患者的 OS 与其相关临床病理特征进行单因素 COX 回归分析(表 1),结果(表 1)发现, T 分期 ($P < 0.01$)、N 分期 ($P < 0.01$)、M 分期 ($P < 0.05$)、临床病理分期 ($P < 0.01$)、淋巴血管浸润 ($P < 0.01$)、是否接受放疗 ($P = 0.01$)、GSDME 的表达量 ($P < 0.05$) 为鼻咽癌不良预后的风险因素。再纳入上述风险因素进行多因素 COX 回归分析(表 2)。最终筛选得 N 分期 ($P = 0.01$)、M 分期 ($P = 0.021$)、是否接受放疗 ($P < 0.01$)、GSDME 表达量 ($P = 0.02$) 等为影响患者预后的独立危险因素。采用这些危险因素作为制作临床预后列线图参数,以预测具体临床患者的生存率。

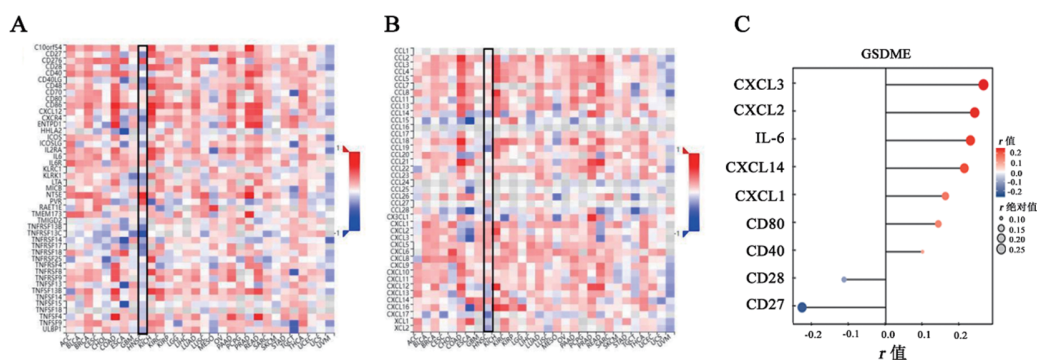
2.6 列线图 and 校正图能较好地预测鼻咽癌患者 OS

基于 N 分期、治疗方法、GSDME 表达水平等因素绘制列线图,对鼻咽癌患者 1 年、2 年、3 年的 OS 率进行分析(图 7)。列线图显示癌症进展到中晚期,肿瘤已侵袭淋巴管、未接受放疗、GSDME 高表达的患者总得分在 200~280 之间,对应的 OS 率分别是 1 年 50%~60%、2 年 20%~30%、3 年 0~20%。为了验证列线图的准确性,又制作了校正曲线和时间依赖性 ROC 曲线图(图 8)。校正图显示列线图预测的 OS 率在理想线附近波动,重合度较高。时间依赖性 ROC 曲线 $AUC > 0.5$,说明 GSDME 的表达可以预测鼻咽癌患者预后。



A、B、C和D分别是GSDME mRNA表达与CD276、CHEK1、CD274和STAT1 mRNA表达的相关性。

图4 GSDME的表达与免疫检查点分子表达的相关性分析图



A、B: 鼻咽癌组织中与GSDME相关基因表达的热图; C: GSDME与免疫激活分子和趋化因子表达的相关性。

图5 GSDME的表达与免疫激活分子、趋化因子表达的相关性分析

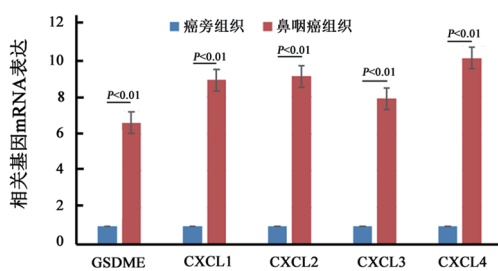


图6 qPCR检测GSDME、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL14在中国人鼻咽癌组织及其相应癌旁组织中的表达

2.7 鼻咽癌组织中GSDME高表达的患者预后较差

根据GSDME表达的中位数(M=3.88)将患者分为高与低表达两组,然后对患者预后进行Kaplan-Meier生存分析,分别分析了鼻咽癌患者的OS率、疾病特异性生存期(disease specific survival, DSS)和无瘤间期(progression free interval, PFI)。三种Kaplan-Meier曲线图均显示高表达GSDME患者的OS、DSS和PFI均比低表达患者差(图9,均 $P < 0.01$),进一步证实了GSDME的表达量可预测鼻咽癌患者预后。

3 讨论

细胞焦亡主要由GSDM蛋白家族和半胱天冬酶(caspase, CASP)执行,其与细胞凋亡不同,焦亡细胞不会立即被吞噬细胞清理,其细胞膜破裂导致多种内容物释放,从而影响肿瘤免疫微环境^[15]。相关研

究^[16]证实细胞焦亡对癌症进展有两重性影响:一方面肿瘤细胞焦亡利于免疫细胞募集,加强了免疫系统对肿瘤组织的识别与清理,抑制癌症的进展;另一方面过度的细胞焦亡释放更多炎症因子损伤正常细胞,促进上皮-间充质转化、血管形成,最终导致肿瘤的侵袭与转移。以往研究^[4,17-18]发现,细胞焦亡相关mRNA和lncRNA在乳腺癌中发挥双重作用,既可以增强免疫反应来对抗癌症,也可以诱导肿瘤组织形成缺氧、炎性的环境而促进肿瘤的血管侵袭。因此探究细胞焦亡相关蛋白GSDME对患者预后及免疫微环境的影响很有必要。

根据生物信息学分析结果及中国患者组织标本验证实验,GSDME在癌组织呈明显高表达。功能富集分析和蛋白质相互作用网络显示,GSDME与CASP、GSDM家族的多种蛋白质分子相互作用介导细胞焦亡、免疫反应,其中CASP3发挥重要作用。相关研究说明化疗药物可以激活CASP3,通过ROS/CASP3/GSDME轴形成GSDME的N端片段,其与其他GSDM族分子共同形成孔隙引起细胞焦亡^[2];还在线粒体膜上形成孔隙,造成线粒体损伤,释放细胞色素C,进一步增强CASP3活化^[18]。本研究免疫浸润分析表明,GSDME的表达量与中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、DC等的浸润呈正相关,与B细胞、CD8⁺T细胞等特异性免疫细胞的浸润呈负相关,提示GSDME在鼻咽癌微环境中的高表达不利于免疫系统抗肿瘤。

为进一步探究GSDME表达对于鼻咽癌患者的预后预测价值,基于各项影响预后的风险因素制作列线图 and 校正图,以具体预测患者预后。验证列线图准确性的时间依赖性ROC曲线 $AUC > 0.5$,说明了GSDME具有预测患者预后的功能。以GSDME表达的高与低分组,并进行生存分析,结果均说明在鼻咽癌组织中GSDME高表达的患者预后不佳。

表1 鼻咽癌患者OS率与病理特征的单因素COX回归分析

病理特征	HR(95% CI)	P值
T分期		<0.001
T1	对照	
T2	1.341(0.694, 2.590)	0.382
T3	2.592(1.349, 4.984)	0.004
T4	2.347(1.250, 4.407)	0.008
N分期		<0.001
N0	对照	
N1	0.957(0.563, 1.624)	0.870
N2&N3	2.269(1.617, 3.183)	< 0.001
M分期(M0 vs M1)	22.631(2.830, 180.948)	0.003
临床病理分期		0.001
I & II	对照	
III&IV	1.839(1.236, 2.737)	0.003
性别		0.065
女性	对照	
男性	0.760(0.571, 1.012)	0.061
年龄		0.089
≤60	对照	
>60	1.262(0.964, 1.653)	0.090
淋巴血管浸润		0.002
是	对照	
否	0.585(0.417, 0.821)	0.002
接受放疗		0.002
是	对照	
否	1.620(1.195, 2.197)	0.002
GSDME	1.168(1.034, 1.320)	0.013

表2 鼻咽癌患者OS率与临床特征的多因素COX回归分析

病理特征	HR(95% CI)	P值
T分期		
T1、T2	对照	
T3、T4	1.922(0.833, 4.435)	0.126
N分期		
N0	对照	
N1	0.745(0.327, 1.697)	0.484
N2&N3	2.130(1.195, 3.797)	0.010
M分期(M0 vs M1)	15.306(1.506, 155.572)	0.021
临床病理分期		
I & II	对照	
III&IV	2.242(0.744, 6.754)	0.151
淋巴血管浸润		
是	对照	
否	0.648(0.397, 1.059)	0.083
接受放疗		
是	对照	
否	3.096(1.913, 5.010)	<0.001
GSDME	1.185(1.027, 1.367)	0.020

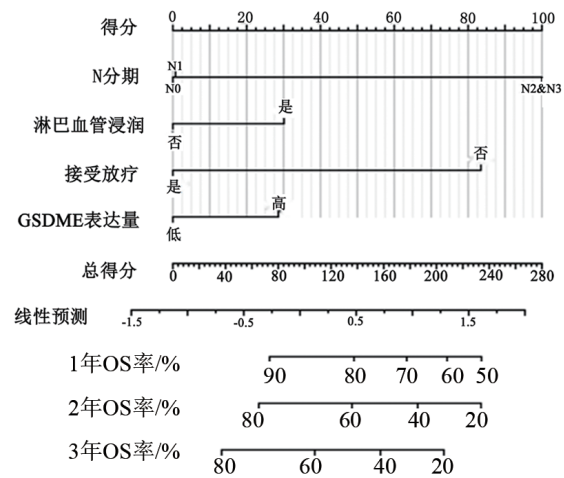
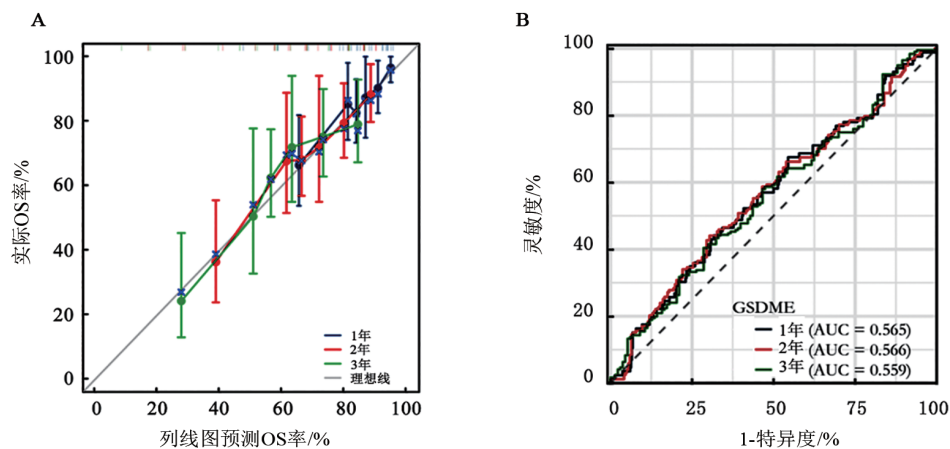
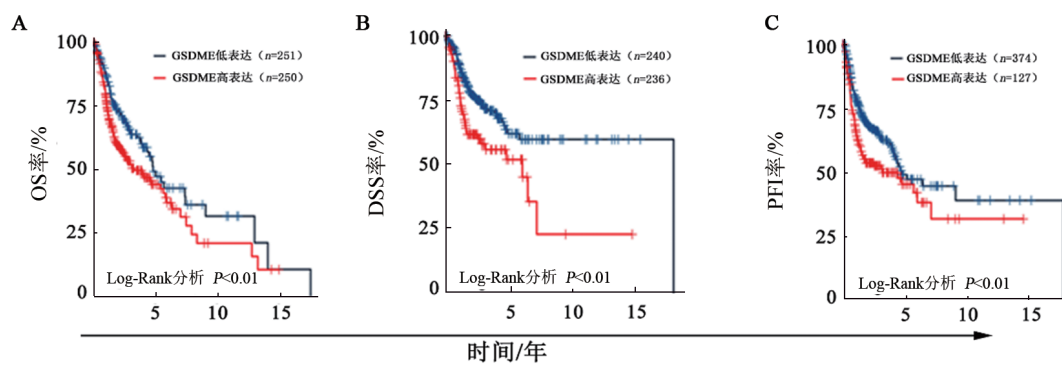


图7 预测鼻咽癌患者临床预后的列线图模型



A:列线图的校正曲线;B:时间依赖性ROC曲线。

图8 利用校正曲线和时间依赖性ROC曲线验证列线图的准确性



A~C:GSDME 高低表达与鼻咽癌患者 OS(A)、DSS(B)和 PFI(C)的关系。

图9 根据 GSDME 表达的高低进行鼻咽癌患者生存分析

目前常规治疗鼻咽癌的方法为放化疗结合,主要作用为诱导癌细胞凋亡,但不能改善肿瘤微环境,因此会产生耐药性^[19]。随着肿瘤微环境中免疫检查点 PD-1/PD-L1 的发现免疫检测点抑制剂开始用于多种肿瘤的治疗^[20],其中,PD-1 通过 IFN- γ /JAK/STAT1 途径抑制抗肿瘤免疫反应^[21]。此外,癌细胞表达的 PD-L1 与 B7 作用在 T 细胞上产生负调控信号,减弱免疫系统对肿瘤的监测^[22]。目前免疫检查点抑制剂已成为治疗鼻咽癌的热点方法,2021 年 PD-1 抑制剂已被批准用于复发性和转移性鼻咽癌治疗,并可联合吉西他滨、顺铂等化疗药物治疗^[23]。本研究中相关性分析表明,GSDME 高表达与相关免疫检查点分子的表达呈正相关,包括 CD276、PD-L1、CHEK1、STAT1。研究^[24]表明,CD276 在头颈部鳞状细胞癌中帮助肿瘤逃逸免疫监视,促进肿瘤的转移。CHEK1 的高表达与耐药性,生存时间缩短有关^[25]。肿瘤微环境中过表达 STAT1 会促进多种炎症因子释放,从而形成慢性炎症,造成缺氧,加剧肿瘤发生发展^[26-27]。由于上文提到细胞焦亡具有双重性,因此 GSDME 可作为潜在标志物预测免疫检查点抑制剂的疗效,从而评估治疗的效果^[28]。

此外,本研究还分析了 GSDME 表达与多种免疫分子表达的相关性,发现多数免疫激活分子在微环境中表达下调,相关趋化因子的表达与 GSDME 过表达呈正相关。重点选取了相关性较高的四种趋化因子 CXCL1、CXCL2、CXCL3 和 CXCL14 进行 qPCR 实验验证,结果显示 GSDME 和四种趋化因子的表达均在鼻咽癌组织中上调。CXCL1、CXCL2、CXCL3 主要招募中性粒细胞和单核细胞,这些细胞通过分泌 MMP-9 蛋白引起细胞释放血管内皮生成因子^[29],诱导异常肿瘤血管生成,影响正常的血液循环过程^[30]。CXCL14 主要由血管周细胞产生,在鼻咽癌中通过 FGF-2/FGFR1/CXCL14 轴促进 TAM 浸润。CXCL14 除了引发炎症反应还有助于肿瘤转移^[31]。

总之,本研究发现 GSDME 在鼻咽癌组织中呈高表达,高表达 GSDME 鼻咽癌患者的预后不良。创建并验证了鼻咽癌患者预后评估列线图模型,用于评估鼻咽癌患者预后。另外,分析了 GSDME 表达与鼻咽癌免疫微环境之间的相互作用,为免疫治疗新靶点的开发提供了实验资料,也阐释了 GSDME 作为潜在致癌因子的可能机制。

[参考文献]

- [1] WONG K C W, HUI E P, LO K W, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: an evolving paradigm[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (11): 679-695. DOI: 10.1038/s41571-021-00524-x.
- [2] SUN X S, LI X Y, CHEN Q Y, *et al.* Future of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Br J Radiol*, 2019, 92(1102): 20190209[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31265322/>. DOI: 10.1259/bjr.20190209.
- [3] SIAK P Y, KHOO A S B, LEONG C O, *et al.* Current status and future perspectives about molecular biomarkers of nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Cancers*, 2021, 13(14): 3490[2023-01-10]. <https://doi.org/10.3390/cancers13143490>. DOI: 10.3390/cancers13143490.
- [4] SU Z Y, SIAK P Y, LEONG C O, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma and its microenvironment: past, current, and future perspectives[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 840467[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35311066/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.840467.
- [5] LI K, SHI H H, ZHANG B X, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 362[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34620838/>. DOI: 10.1038/s41392-021-00670-9.
- [6] FORDER A, STEWART G L, TELKAR N, *et al.* New insights into the tumour immune microenvironment of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Curr Res Immunol*, 2022, 3: 222-227. DOI: 10.1016/j.crimmu.2022.08.009.
- [7] RAO Z P, ZHU Y T, YANG P, *et al.* Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer[J]. *Theranostics*, 2022, 12(9): 4310-4329. DOI: 10.7150/thno.71086.
- [8] PENG L, ZHU N, WANG D, *et al.* Comprehensive analysis of prognostic value and immune infiltration of NLR4 and CASP1 in colorectal cancer[J]. *Int J Gen Med*, 2022, 15: 5425-5440. DOI:

- 10.2147/ijgm.s353380.
- [9] FU X W, SONG C Q. Identification and validation of pyroptosis-related gene signature to predict prognosis and reveal immune infiltration in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 748039[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34820376/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.748039.
- [10] YIN J, CHE G, WANG W, *et al.* Investigating the prognostic significance of pyroptosis-related genes in gastric cancer and their impact on cells' biological functions[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 861284[2023-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8995648/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.861284.
- [11] HUANG Y L, ZHANG G H, ZHU Q, *et al.* Expression levels of caspase-3 and gasdermin E and their involvement in the occurrence and prognosis of lung cancer[J/OL]. *Cancer Rep (Hoboken)*, 2022, 5 (9): e1561[2023-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9458510/>. DOI: 10.1002/cnr2.1561.
- [12] LEI X, LEI Y, LI J K, *et al.* Immune cells within the tumor microenvironment: biological functions and roles in cancer immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 126-133. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.11.009.
- [13] JANSE R J, HOEKSTRA T, JAGER K J, *et al.* Conducting correlation analysis: important limitations and pitfalls[J]. *Clin Kidney J*, 2021, 14(11): 2332-2337. DOI: 10.1093/ckj/sfab085.
- [14] ESKANDARI E, EAVES C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis[J/OL]. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e202201159[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35551578/>. DOI: 10.1083/jcb.202201159.
- [15] HSU S K, LI C Y, LIN I L, *et al.* Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment[J]. *Theranostics*, 2021, 11(18): 8813-8835. DOI: 10.7150/thno.62521.
- [16] LOVELESS R, BLOOMQUIST R, TENG Y. Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 264[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34429144/>. DOI: 10.1186/s13046-021-02065-8.
- [17] LV W C, TAN Y F, ZHAO C R, *et al.* Identification of pyroptosis-related lncRNAs for constructing a prognostic model and their correlation with immune infiltration in breast cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(22): 10403-10417. DOI: 10.1111/jcmm.16969.
- [18] TAN Y X, CHEN Q Z, LI X L, *et al.* Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 153[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8091792/>. DOI: 10.1186/s13046-021-01959-x.
- [19] GONG L Q, KWONG D L W, DAI W, *et al.* The stromal and immune landscape of nasopharyngeal carcinoma and its implications for precision medicine targeting the tumor microenvironment[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 744889[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34568077/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.744889.
- [20] WANG S L, CHEN S Y, ZHONG Q L, *et al.* Immunotherapy for the treatment of advanced nasopharyngeal carcinoma: a promising new era[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022: 1-9. DOI: 10.1007/s00432-022-04214-8.
- [21] CHA J H, CHAN L C, LI C W, *et al.* Mechanisms controlling PD-L1 expression in cancer[J]. *Mol Cell*, 2019, 76(3): 359-370. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.09.030.
- [22] AKINLEYE A, RASOOL Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 92[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31488176/>. DOI: 10.1186/s13045-019-0779-5.
- [23] XU J Y, WEI X L, WANG Y Q, *et al.* Current status and advances of immunotherapy in nasopharyngeal carcinoma[J/OL]. *Ther Adv Med Oncol*, 2022, 14: 17588359221096214[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC9083041/>. DOI: 10.1177/17588359221096214.
- [24] WANG C, LI Y, JIA L F, *et al.* CD276 expression enables squamous cell carcinoma stem cells to evade immune surveillance[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(9): 1597-1613. DOI: 10.1016/j.stem.2021.04.011.
- [25] NEIZER-ASHUN F, BHATTACHARYA R. Reality CHEK: understanding the biology and clinical potential of CHK₁[J]. *Cancer Lett*, 2021, 497: 202-211. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.016.
- [26] VERHOEVEN Y, TILBORGHES S, JACOBS J, *et al.* The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 41-56. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.10.002.
- [27] LOH C Y, ARYA A, NAEMA A F, *et al.* Signal transducer and activator of transcription (STATs) proteins in cancer and inflammation: functions and therapeutic implication[J/OL]. *Front Oncol*, 2019, 9: 48[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6393348/>. DOI: 10.3389/fonc.2019.00048.
- [28] LI L S, JIANG M X, QI L, *et al.* Pyroptosis, a new bridge to tumor immunity[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(10): 3979-3994. DOI: 10.1111/cas.15059.
- [29] KORBECKI J, SIMIŃSKA D, GAŚSOWSKA-DOBROWOLSKA M, *et al.* Chronic and cycling hypoxia: drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF- κ B activation: a review of the molecular mechanisms[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10701[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34639040/>. DOI: 10.3390/ijms221910701.
- [30] KORBECKI J, KOJDER K, KAPCZUK P, *et al.* The effect of hypoxia on the expression of CXC chemokines and CXC chemokine receptors-a review of literature[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 843[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33467722/>. DOI: 10.3390/ijms22020843.
- [31] WANG Y J, SUN Q, YE Y, *et al.* FGF-2 signaling in nasopharyngeal carcinoma modulates pericyte-macrophage crosstalk and metastasis[J/OL]. *JCI Insight*, 2022, 7(10): e157874[2023-01-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35439170/>. DOI: 10.1172/jci.insight.157874.

[收稿日期] 2023-02-17

[修回日期] 2023-04-12

[本文编辑] 向正华, 沈志超