·论著·

CB-103通过ROS/caspase-3/GSDME信号通路对口腔鳞状细胞癌细胞焦亡的影响

汤宏超[1],郑曦[1],张玲阁[1],杨雷雷[2]
(1.郑州市口腔医院口腔颌面外科,郑州 450000;2.郑州大学第一附属医院口腔颌面外科,郑州 450000)

摘要 目的 探讨CB-103通过活性氧(ROS)/胱天蛋白酶3(caspase-3)/消皮素E(GSDME)信号通路对口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞焦亡的影响。**方法** 用不同浓度(0、20、40、60、80、100 μg/mL)的CB-103处理口腔鳞状细胞癌细胞系SCC-7。采用CCK-8试剂盒检测细胞增殖活性;应用划痕实验观察细胞迁移运动;倒置显微镜下实时监测细胞形态变化。应用Western blotting检测GSDME、GSDME-N端、裂解caspase-3蛋白的表达水平;采用ATP检测试剂盒检测细胞中ATP释放水平;应用免疫荧光法检测细胞内高迁移率组蛋白1(HMGB1)和ROS水平。**结果** 与对照组相比,CB-103可以抑制SCC-7细胞增殖活性并抑制细胞迁移。CB-103可诱导细胞ROS水平升高,上调裂解caspase-3蛋白的表达;促进切割GSDME,增加 GSDME-N端的数量(均$P<0.05$),从而诱导SCC-7细胞发生细胞焦亡。**结论** CB-103通过诱导ROS/caspase-3/GSDME途径,促进OSCC细胞焦亡。

关键词 CB-103;口腔鳞状细胞癌;细胞焦亡;活性氧
中图分类号 R739.8 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)06-0553-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250606.1518.010
DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2025.06.013

Effect of CB-103 on pyroptosis in oral squamous cell carcinoma cells via the ROS/caspase-3/GSDME signaling pathway

TANG Hongchao[1],ZHENG Xi[1],ZHANG Lingge[1],YANG Leilei[2]
(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery,Zhengzhou Stomatological Hospital,Zhengzhou 450000,China;2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery,The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University,Zhengzhou 450000,China)

Abstract Objective To explore the effect of CB-103 on pyroptosis in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells via the reactive oxygen species (ROS)/caspase-3/gasdermin-E (GSDME) signaling pathway. **Methods** The OSCC cell line SCC-7 was treated with varying concentrations of CB-103 (0,20,40,60,80,and 100 μg/mL). The proliferation activity of CB-103 cells was measured using cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The cell migration was assessed using a wound-healing assay. Morphological changes in the cells were observed under an inverted microscope. Western blotting was performed to evaluate the protein expression of GSDME,GSDME-N terminal,and cleaved caspase-3. ATP release was measured using an ATP detection kit. The levels of intracellular high-mobility group box 1 (HMGB1) and ROS were quantified by immunofluorescence. **Results** Compared to the control group,CB-103 inhibited the proliferation and migration of SCC-7 cells. Additionally,CB-103 increased ROS levels and upregulated the expression of cleaved caspase-3 protein. Furthermore,CB-103 promoted the cleavage of GSDME and increased the number of GSDME-N terminal fragments (all $P<0.05$),thereby inducing pyroptosis in SCC-7 cells. **Conclusion** CB-103 promotes pyroptosis in OSCC cells by activating the ROS/caspase-3/GSDME pathway.

Keywords CB-103; oral squamous cell carcinoma; pyroptosis; reactive oxygen species

头颈部鳞状细胞癌是最常见的癌症类型之一,其中口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)占90%[1]。人乳头瘤病毒感染、吸烟、酗酒以及咀嚼槟榔是OSCC的主要致病因素[2]。临床中发现,OSCC患者易发生淋巴结转移,在确诊时多已是晚期,手术切除、放化疗以及免疫疗法被视为治疗OSCC的标准方法,然而由于肿瘤的易转移性,治疗后患者的5年生存率仍不超过50%[3]。因此,需进一步探索更有效的治疗方法。

细胞焦亡是一种程序性细胞死亡形式,由胱天蛋白酶(caspase)参与激活,通过消皮素蛋白家族在

基金项目:河南省医学科技攻关计划(LHGJ20220383)
作者简介:汤宏超(1995-),男,主治医师,硕士.
通信作者:汤宏超,E-mail:754856165@qq.com
收稿日期:2024-09-23
网络出版时间:2025-06-09 14:22:43

质膜上形成孔隙，导致胞膜完整性被破坏，进而释放大量胞内物质和炎性细胞因子[4]。研究[5]表明，抗肿瘤疗法可导致肿瘤细胞以包括细胞凋亡、细胞焦亡和铁死亡在内的多种方式死亡，而易发生焦亡的肿瘤细胞对化疗药物更敏感。因此，探索肿瘤细胞焦亡的发生和发展机制，对于制定抗肿瘤策略至关重要。

Notch信号通路是一种进化上高度保守的信号转导通路，在多种细胞发育过程中扮演关键角色，其在肿瘤中与肿瘤干细胞的增殖、分化和肿瘤潜在的侵袭或转移密切相关[6]。CB-103作为一种Notch信号通路抑制剂，已被证明可在多种类型肿瘤中发挥抗肿瘤作用[6-7]。无论是单独使用还是与靶向治疗联合应用，CB-103均在临床前模型中表现出强大的抗肿瘤活性[8]。然而，CB-103在OSCC治疗中的作用目前尚不完全清楚。本研究通过探索CB-103对OSCC细胞的影响并分析相关作用机制，为CB-103临床试验的开展及其应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

OSCC细胞系SCC-7，购自美国模式培养物集存库；消皮素E（gasdermin E，GSDME）抗体，购自英国abcam公司；caspase-3抗体、高迁移率组蛋白1（high-mobility group box 1，HMGB1）抗体，购自美国CST公司；ATP检测试剂盒、活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒，购自上海碧云天生物技术股份有限公司；CB-103，购自美国MedChemExpress公司。

1.2　方法

1.2.1 细胞培养：用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养基培养SCC-7细胞，在37 ℃、5%CO_2培养箱中传代培养。

1.2.2　细胞活力检测：以1×10^5/孔的细胞密度将SCC-7细胞接种于6孔板中，细胞贴壁后使用不同浓度（0、20、40、60、80、100 μg/mL）的CB-103处理细胞，采用CCK-8试剂盒检测细胞增殖活性。重复接种操作，在细胞贴壁后通过划痕实验观察不同浓度（0、10、20 μg/mL）的CB-103处理细胞后划痕宽度的变化。

1.2.3　细胞形态学检测：以1×10^5/孔的细胞密度将SCC-7细胞接种于6孔板中，细胞贴壁后加入不同浓度（0、50、100 μg/mL）的CB-103，倒置显微镜下监测细胞形态随时间的变化情况，采集图像。

1.2.4　OSCC相关蛋白表达水平检测：用不同浓度（0、20、40、60、80、100 μg/mL）的CB-103处理SCC-7细胞。收集不同处理条件下的各组细胞，加裂解液提取蛋白，测定蛋白浓度。记录完成后依次进行上样，电泳，转膜。加入GSDME、caspase-3和β肌动蛋白（β-actin）一抗孵育液，4 ℃过夜。第2天用TBST洗膜3次，加入二抗孵育液，室温孵育2 h，洗膜3次。显影、曝光后采集图像，应用ImageJ软件进行分析。

1.2.5　细胞ATP和HMGB1释放水平以及细胞内ROS水平检测：以1×10^5/孔的细胞密度将SCC-7细胞接种于6孔板中，分别加入不同浓度（0、20、40、60、80、100 μg/mL）的CB-103处理细胞24 h，去除细胞培养液，洗涤，采用ATP检测试剂盒检测ATP水平，采用免疫荧光法检测HMGB1水平。配置ROS染色工作液，处理细胞后，荧光显微镜下观察细胞内ROS水平。采集各组图像，进行统计分析。

1.3　统计学分析

使用GraphPad Prism 9.0软件进行数据分析和绘图。计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用独立样本t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CB-103抑制OSCC细胞增殖活性和细胞迁移

使用不同浓度（0、20、40、60、80、100 μg/mL）的CB-103处理SCC-7细胞，应用CCK-8试剂盒检测细胞活性和增殖情况。0、20、40、60、80、100 μg/mL CB-103组SCC-7细胞的相对活力分别为100%、（86.27 ± 3.41）%、（74.87 ± 3.81）%、（61.67 ± 14.8）%、（47.13 ± 1.49）%、（37.52 ± 6.68）%。与对照组（0 μg/mL）相比，40、60、80、100 μg/mL CB-103组SCC-7细胞增殖活性均降低（均$P<0.05$）；且60、80、100 μg/mL CB-103组与20 μg/mL CB-103组相比，80、100 μg/mL CB-103组与40 μg/mL CB-103组相比，100 μg/mL CB-103组与60 μg/mL CB-103组相比，SCC-7细胞增殖活性均降低（均$P<0.05$）。结果提示，CB-103浓度越高，SCC-7细胞增殖活性越低。

在CB-103处理细胞0、12、24和36 h后，通过划痕实验观察细胞迁移情况。结果（图1）显示，与对照组

（0 μg/mL）相比，10和20 μg/mL CB-103组SCC-7细胞的迁移能力均降低，且随着CB-103浓度的增加，细胞迁移被抑制现象更明显。上述结果表明，CB-103对OSCC细胞的生长和迁移具有显著抑制作用。

2.2　CB-103诱导OSCC细胞产生焦亡样表型

为了进一步探究CB-103抑制OSCC细胞的作用机制，倒置显微镜下实时观察和拍摄不同浓度（0、50、100 μg/mL）的CB-103处理SCC-7细胞24 h后细胞的生长和形态变化。结果（图2）显示，与对照组（0 μg/mL）相比，50和100 μg/mL CB-103组的SCC-7细胞均出现细胞肿胀和细胞膜上形成大量气泡的焦亡样表型，且随着CB-103浓度的增加，发生溶胀崩解和内容物释放的细胞数量增加。结果表明，发生焦亡的细胞数量增加且与CB-103浓度相关。

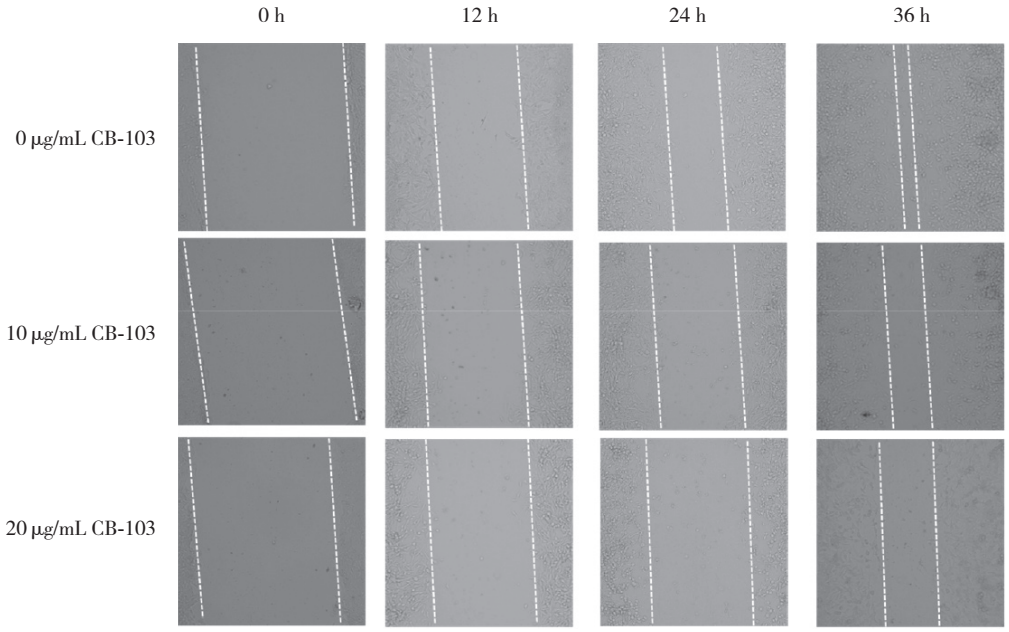


图1　CB-103对SCC-7细胞迁移的影响　×10

Fig.1　Effects of CB-103 on the migration of SCC-7 cells　×10

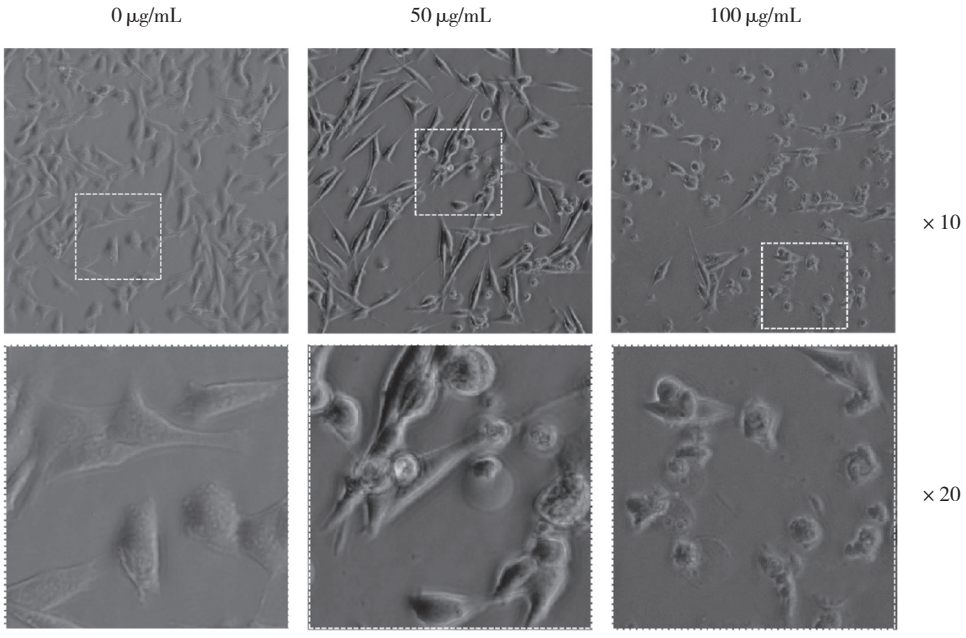


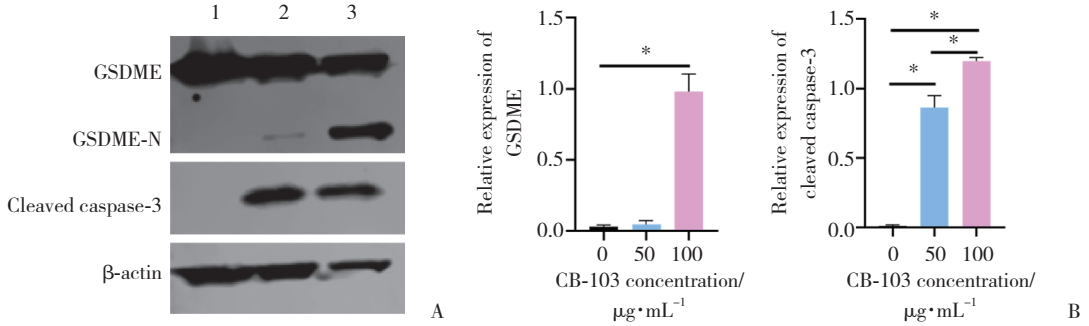
图2　CB-103对SCC-7细胞生长和形态变化的影响

Fig.2　Effects of CB-103 on the growth and morphological changes of SCC-7 cells

2.3　CB-103通过caspase-3/GSDME通路诱导OSCC细胞焦亡

为了分析CB-103诱导OSCC细胞发生焦亡的分子机制，应用Western blotting检测细胞中GSDME、GSDME-N端片段以及裂解caspase-3（cleaved caspase-3）的表达水平。结果（图3）显示，与对照组（0 μg/mL）相比，50和100 μg/mL CB-103组SCC-7细胞中GSDME-N端和cleaved caspase-3的相对表达量明显增加（$P < 0.05$）。

2.4　CB-103使细胞中ATP和HMGB1水平升高



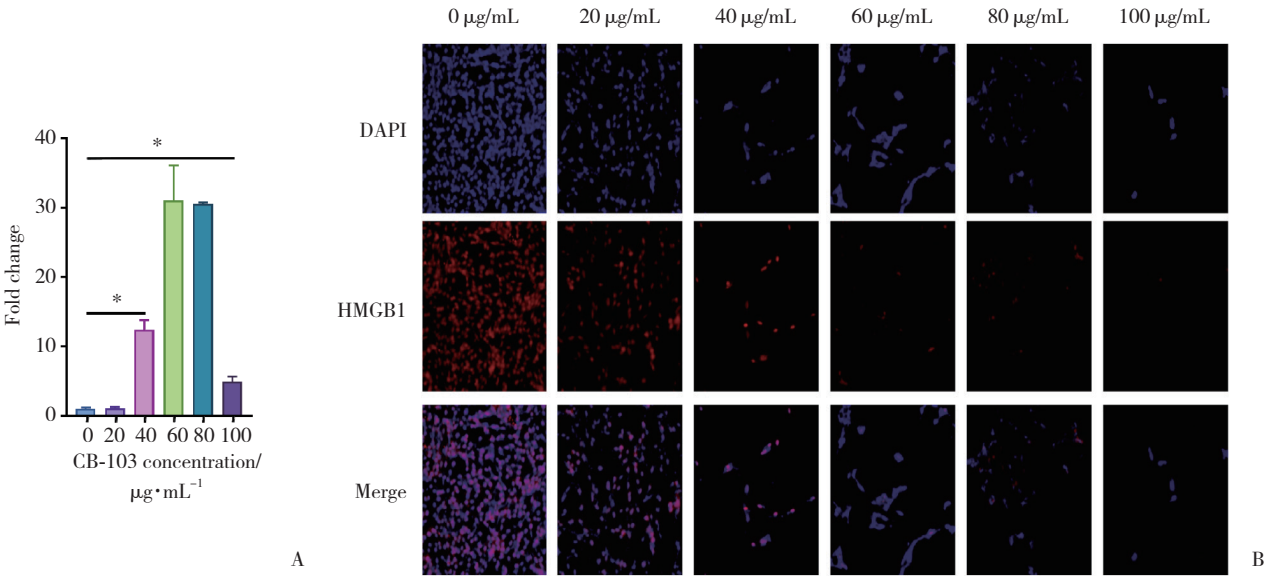
A，expression levels of GSDME，GSDME-N，and cleaved caspase-3 in SCC-7 cells following CB-103 treatment；B，results of the statistical analysis. 1，0 μg/mL CB-103；2，50 μg/mL CB-103；3，100 μg/mL CB-103. * $P < 0.05$.

图3　CB-103对SCC-7细胞中GSDME、GSDME-N、cleaved caspase-3蛋白表达水平的影响

Fig.3　Effects of CB-103 on the expression levels of GSDME，GSDME-N，and cleaved caspase-3 proteins in SCC-7 cells

用不同浓度（0、20、40、60、80、100 μg/mL）的CB-103处理SCC-7细胞后，应用ATP检测试剂盒检测细胞内ATP水平的变化。结果（图4A）显示，与对照组（0 μg/mL）相比，40、60、80、100 μg/mL CB-103组SCC-7细胞中ATP水平显著升高（均$P < 0.05$）。除100 μg/mL CB-103组外，细胞中ATP释放水平呈CB-103浓度依赖性。

应用免疫荧光法检测细胞中HMGB1水平的变化。结果（图4B）显示，与对照组（0 μg/mL）相比，20、40、60、80、100 μg/mL CB-103组SCC-7细胞中HMGB1水平逐渐降低。以上结果表明，在CB-103的刺激下，SCC-7细胞发生焦亡，胞膜溶胀崩解，通透性改变，引起细胞内炎性物质ATP和HMGB1从细胞中逐渐释放至细胞外。



A，effect of CB-103 on ATP levels；B，effect of CB-103 on intracellular HMGB1 levels（× 20）. * $P < 0.05$.

图4　CB-103对SCC-7细胞中ATP和HMGB1水平的影响

Fig.4　Effects of CB-103 on ATP and HMGB1 levels in SCC-7 cells

2.5　CB-103引起细胞中ROS水平升高

为进一步探究CB-103诱导OSCC细胞发生caspase-3/GSDME通路依赖性焦亡的调控机制，本研究检测了在CB-103刺激下SCC-7细胞中ROS水平的变化。用不同浓度（0、20、40、60、80、100 μg/mL）的CB-103刺激SCC-7细胞，结果（图5）显示，与对照组（0 μg/mL）相比，20、40、60、80、100 μg/mL CB-103组SCC-7细胞内ROS水平均显著增加，且这种刺激作用程度与CB-103浓度相关。结果表明，CB-103可能通过改变OSCC细胞内的ROS水平，诱导细胞焦亡。

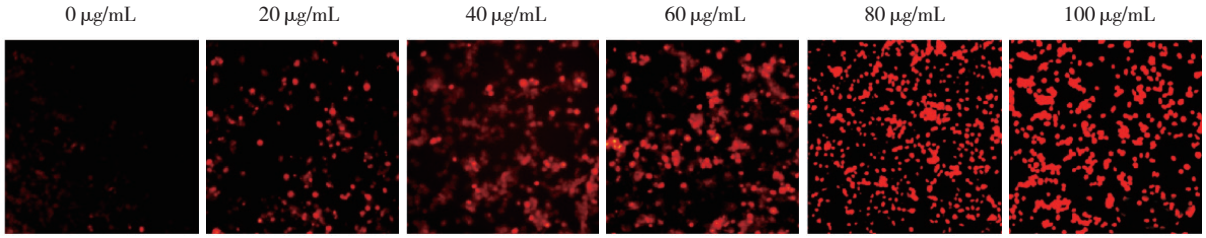


图5　CB-103对SCC-7细胞中ROS释放水平的影响　×20

Fig.5　Effect of CB-103 on ROS release levels in SCC-7 cells　×20

3　讨论

鳞状细胞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤，好发于舌、颊、牙龈等部位，因其发生部位的特殊性，严重影响患者的生存和生活质量。目前，OSCC患者面临治疗抵抗频发以及5年生存率较低的问题，因此亟待探索更有效的治疗策略。

CB-103是一种高度特异性的蛋白质–蛋白质相互作用抑制剂，可干扰Notch受体活性胞内结构域与CSL转录因子复合物间的相互作用，导致致癌途径激活的转录下调[9]。为了探索CB-103在治疗OSCC过程中发挥的作用，本研究使用不同浓度的CB-103处理SCC-7细胞，结果发现，CB-103可诱导细胞发生焦亡。

当细胞发生焦亡时，在质膜上形成大量孔隙，最终引起细胞破裂，释放细胞内容物，从而激活强烈的炎症和免疫反应[4]。本研究发现，CB-103刺激SCC-7细胞后，细胞增殖活性和细胞迁移运动被明显抑制。显微镜下观察，可见癌细胞肿胀变形，胞膜上形成突出物，最终破裂崩解，这表明了细胞焦亡的发生。由此表明，CB-103可通过促进OSCC细胞发生焦亡，进而发挥抗肿瘤作用。

GSDME是消皮素家族中成孔蛋白的前体，而消皮素家族蛋白的分裂可引发细胞焦亡[10]。本研究发现，在CB-103的刺激下，SCC-7细胞中GSDME以浓度和时间依赖性方式被激活，细胞中cleaved caspase-3蛋白的表达量以及GSDME-N端片段数量均明显增加，说明cleaved caspase-3在细胞中发挥剪切GSDME蛋白的作用。由于天然切割位点的存在，激活的caspase-3可以切割 GSDME的特定位点，释放活性N末端结构域，介导细胞穿孔，并释放大量炎性细胞因子以诱导细胞焦亡[11]。因此，CB-103可通过caspase-3/GSDME途径诱导OSCC细胞焦亡。

本研究发现，随着CB-103浓度的增加，SCC-7细胞中ATP释放水平显著升高，HMGB1水平逐渐降低。本研究中，100 μg/mL CB-103组与40、60、80 μg/mL CB-103组相比，细胞中ATP释放水平降低，这是因为100 μg/mL的CB-103浓度较高，使得细胞过早死亡，ATP释放出后被降解，因此在检测时环境内ATP水平已经降低。这些结果证明了细胞膜完整性被破坏，炎症内容物被释放。ATP可激活嘌呤能受体P2X配体门控离子通道，破坏质膜的完整度，扰乱质膜对K^+的通透性，导致胞质中K^+浓度降低，从而参与激活炎症小体NLRP3。炎症小体是细胞内的蛋白质复合物，可激活炎性caspase，诱导免疫反应和焦亡[12]。

为了探究影响caspase-3/GSDME信号通路诱导细胞焦亡的上游调控分子，本研究用不同浓度梯度的CB-103处理SCC-7细胞，发现细胞中ROS水平显著升高。先前有研究[13]发现，过量的ROS可以促进细胞内GSDME活化。线粒体是细胞ATP和关键代谢物的主要来源，过量的ROS是线粒体功能障碍的副产物，

是线粒体膜氧化损伤和通透性改变的典型特征[14]。此外，线粒体与NLRP3炎症小体间的直接或间接相互作用可导致线粒体不稳定和NLRP3去泛素化，从而促进NLRP3炎症小体触发焦亡[15]。因此，本研究结果提示，CB-103可能诱发了线粒体功能障碍，引起肿瘤细胞内ROS释放量增加，从而促进caspase-3/GSDME通路诱导的细胞焦亡。

本研究存在一定的局限性：未充分探究ROS对caspase-3/GSDME信号通路的具体调控蛋白，以及其含量影响细胞焦亡的分子机制。

综上所述，本研究发现CB-103可通过促进OSCC细胞发生焦亡进而发挥抗肿瘤作用，并初步证实了CB-103通过激活ROS/caspase-3/GSDME信号通路诱导细胞焦亡。今后应进一步开展动物实验，以探究CB-103对OSCC负瘤小鼠生存的影响及其浓度变化引发的相关机体反应。

参考文献：

[1] BUGSHAN A，FAROOQ I. Oral squamous cell carcinoma：metastasis，potentially associated malignant disorders，etiology and recent advancements in diagnosis [J]. F1000Res，2020，9：229. DOI：10.12688/f1000research.22941.1.

[2] 侯承素，殷玉兰，张于涵，等. 复发性舌鳞状细胞癌复发时间及预后相关影响因素研究 [J]. 中国实用口腔科杂志，2023，16 (6)：676-681. DOI：10.19538/j.kq.2023.06.007.

[3] 房旭，刘维贤. 环状RNA has_circ_0009043在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 中国医科大学学报，2022，51 (7)：633-637. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2022.07.011.

[4] 关冀弛，杨金雨，刘丹，等. 丙泊酚作用NLRP3/ASC/caspase-1通路对肺癌A549细胞焦亡的影响 [J]. 中国医科大学学报，2024，53 (2)：132-135. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2024.02.007.

[5] WU MJ，WANG Y，YANG D，et al. A PLK1 kinase inhibitor enhances the chemosensitivity of cisplatin by inducing pyroptosis in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. EBioMedicine，2019，41：244-255. DOI：10.1016/j.ebiom.2019.02.012.

[6] HANNA GJ，STATHIS A，LOPEZ-MIRANDA E，et al. A phase Ⅰ study of the pan-Notch inhibitor CB-103 for patients with advanced adenoid cystic carcinoma and other tumors [J]. Cancer Res Commun，2023，3 (9)：1853-1861. DOI：10.1158/2767-9764.CRC-23-0333.

[7] VIGOLO M，URECH C，LAMY S，et al. The efficacy of CB-103，a first-in-class transcriptional Notch inhibitor，in preclinical models of breast cancer [J]. Cancers，2023，15 (15)：3957. DOI：10.3390/cancers15153957.

[8] FABBRO D，BAUER M，MURONE M，et al. Notch inhibition in cancer：challenges and opportunities [J]. Chimia，2020，74 (10)：779-783. DOI：10.2533/chimia.2020.779.

[9] MAJUMDER S，CRABTREE JS，GOLDE TE，et al. Targeting Notch in oncology：the path forward [J]. Nat Rev Drug Discov，2021，20：125-144. DOI：10.1038/s41573-020-00091-3.

[10] DENG BB，JIAO BP，LIU YJ，et al. BIX-01294 enhanced chemotherapy effect in gastric cancer by inducing GSDME-mediated pyroptosis [J]. Cell Biol Int，2020，44 (9)：1890-1899. DOI：10.1002/cbin.11395.

[11] 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. DOI：10.1038/s41419-021-03458-5.

[12] YANG D，HE Y，MUÑOZ-PLANILLO R，et al. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock [J]. Immunity，2015，43 (5)：923-932. DOI：10.1016/j.immuni.2015.10.009.

[13] 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. DOI：10.1016/j.apsb.2020.06.015.

[14] SHANGGUAN F，ZHOU H，MA N，et al. A novel mechanism of cannabidiol in suppressing hepatocellular carcinoma by inducing GSDME dependent pyroptosis [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：697832. DOI：10.3389/fcell.2021.697832.

[15] XU W，CHE Y，ZHANG Q，et al. Apaf-1 pyroptosome senses mitochondrial permeability transition [J]. Cell Metab，2021，33 (2)：424-436.e10. DOI：10.1016/j.cmet.2020.11.018.

（编辑　陈　姜）