

焦亡核心分子GSDME作为与预后和免疫相关的肝癌新型生物标志物

方灵燕*, 韦常宏*, 陶文富*, 李少芳, 钟晓凤, 李 静, 巫雅丽, 覃 政#, 文延峰#

南宁市第一人民医院医学检验科, 广西 南宁

收稿日期: 2023年7月16日; 录用日期: 2023年8月8日; 发布日期: 2023年8月15日

摘 要

目的: GSDME (DFNA5)是焦亡执行蛋白gasdermin家族基因成员之一。大量研究表明GSDME表达与肿瘤发生发展之间存在很强的相关性。然而, GSDME在肝癌中的表达和生物学功能仍不清楚。方法: 我们使用TIMER2.0数据库探讨了泛癌中GSDME的mRNA表达情况。还使用GEPIA和UALCAN数据库来确定HCC中GSDME的mRNA表达和蛋白表达。UALCAN用于分析GSDME和肝癌亚组分级之间的关系。还使用Kaplan-Meier研究了GSDME的表达与肝癌预后的相关性。使用TIMER2.0数据库分析了GSDME表达与肝癌微环境中免疫细胞浸润和免疫检查点之间的相关性。免疫组织化学技术(HPA)用于探索GSDME蛋白在HCC和正常肝组织中的表达情况。结果: 与正常组织相比, GSDME在肝癌中表达上调。肝癌中高GSDME表达预示有较高的组织分级、肿瘤分期和较多的淋巴结转移, 同时高GSDME表达预示总生存期和疾病特异性生存期较差。GSDME的表达与肝癌中B细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和NK细胞的浸润水平显著相关。同时GSDME的表达与免疫治疗检查点PD-1、CTLA4和PD-L1的表达显著相关。结论: 我们的研究表明GSDME在HCC中过表达, 并且GSDME表达与HCC中的免疫浸润和预后显著相关。因此, GSDME可作为肝癌免疫治疗和预后的生物标志物。

关键词

GSDME, 肝癌, 焦亡, 免疫浸润, 预后

Pyroptotic Core Molecule GSDME as a Novel Biomarker for Liver Cancer Related to Prognosis and Immunity

Lingyan Fang*, Changhong Wei*, Wenfu Tao*, Shaofang Li, Xiaofeng Zhong, Jing Li, Yali Wu, Zheng Qin#, Yanfeng Wen#

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 方灵燕, 韦常宏, 陶文富, 李少芳, 钟晓凤, 李静, 巫雅丽, 覃政, 文延峰. 焦亡核心分子 GSDME 作为与预后和免疫相关的肝癌新型生物标志物[J]. 临床医学进展, 2023, 13(8): 12819-12828. DOI: 10.12677/acm.2023.1381797

Abstract

Objective: GSDME (DFNA5) is one of the gene members of pyroptotic executive protein gasdermin family. A large number of studies have shown that there is a strong correlation between the expression of GSDME and the development of tumors. However, the expression and biological functions of GSDME in HCC remain unclear. **Methods:** We used the TIMER2.0 database to explore the mRNA expression of GSDME in pan-cancer. The GEPIA and UALCAN databases were also used to determine the mRNA expression and protein expression of GSDME in HCC. UALCAN was used to analyze the relationship between GSDME and liver cancer subgroup grades. The correlation between the expression of GSDME and the prognosis of liver cancer was also investigated using Kaplan-Meier. The correlation between GSDME expression and immune cell infiltration and immune checkpoints in the HCC microenvironment was analyzed using the TIMER2.0 database. Immunohistochemical technique (HPA) was used to explore the expression of GSDME protein in HCC and normal liver tissues. **Results:** Compared with normal tissues, the expression of GSDME was up-regulated in HCC. High GSDME expression in HCC predicted higher tissue grade, tumor stage and more lymph node metastasis, while high GSDME expression predicted poor overall survival and disease-specific survival. The expression of GSDME was significantly correlated with the infiltration levels of B cells, CD4+T cells, macrophages, neutrophils and NK cells in HCC. At the same time, the expression of GSDME was significantly correlated with the expression of immunotherapy checkpoints PD-1, CTLA4 and PD-L1. **Conclusion:** Our findings suggest that GSDME is overexpressed in HCC, and GSDME expression is significantly associated with immune infiltration and prognosis in HCC. Therefore, GSDME may serve as a biomarker for immunotherapy and prognosis in HCC.

Keywords

GSDME, Liver Cancer, Pyroptosis, Immune Infiltration, Prognosis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝细胞癌(HCC)是一种恶性程度极高的癌症,几乎占原发性肝癌的95% [1]。根据最新的全球癌症统计数据显示,全球报告了约84万例肝癌新发病例和78万例死亡病例,分别占所有癌症病例和死亡病例的4.7%和8.2% [2]。尽管许多患者在早期获得了有效的诊断和治疗,但复发率仍然很高,5年生存率仅为5% [3]。因此,尽管阐明了HCC的发病机制,但其预后仍然很差[4]。因此,迫切需要寻找早期诊断和预后标志物和精准治疗策略,以改善肝癌患者的预后和生活质量。

细胞焦亡是一种新的程序性细胞死亡形式,其特征是细胞肿胀,大气泡从质膜吹出[5]。Gasdermin家族蛋白是执行焦亡的关键蛋白,GSDME (DFNA5)是Gasdermin (GSDM)家族成员之一,GSDME (DFNA5)最初称为常染色体显性耳聋5基因,是在染色体7p15.3上发现的一种特殊形式的常染色体显性、进行性、感觉神经性和非综合征性耳聋[6]。一方面,GSDME在一部分癌症中低表达,并且GSDME表达水平降低也与生存预后降低相关,表明GSDME可能作为抑制因子起到抑癌作用[7]。然而,另一方面,

GSDME 在部分癌症中表达上调, 并且 GSDME 表达水平升高也与生存预后较差相关[8] [9]。随着研究的深入, GSDME 在癌症中的作用越来越突出。目前 GSDME 的结构和功能研究也已在各种癌症中从生理学和病理学方面进行; 然而, 从目前公开的临床资料来看, GSDME 在肝癌中的临床意义尚未完全清楚[9] [10]。

我们的研究首次利用 TCGA 等公共数据库对 GSDME 进行了多组学系统分析, 包括 GSDME 的表达、临床生存预后、免疫细胞浸润和免疫治疗检查点等一系列相关研究, 总体而言, 我们的研究揭示了 GSDME 在肝癌进展的新视角, 并为治疗肝癌提供了潜在的靶点分子。

2. 资料与方法

2.1. GSDME 基因表达的分析

在这项研究, 我们首先运用基于 TCGA 的 TIMER 数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)分析了 32 中常见癌症的 GSDME 基因表达[11]。GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>)是一个交互式在线网络工具, 我们用于分析来自 TCGA 和 GTEx 项目的肝癌组织样本的 GSDME 差异表达[12]。UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/>)是一个基于 TCGA 的网站, 可以用来分析肿瘤和正常组织的相对基因表达, 以及基于种族、肿瘤分级和组织分级的相对基因表达和其他临床病理特征[13]。在这项研究中, 该数据库用于探索 GSDME 在肝癌中不同肿瘤等级中的 mRNA 表达和蛋白表达。

2.2. GSDME 基因在肝癌中的生存分析

Kaplan-Meier 生存数据库(<http://kmplot.com/analysis/>)提供了 10461 个样本的数据分析, 包括胃癌、乳腺癌和 HCC 样本等等[14]。我们根据不同的临床病理变量, 探讨 GSDME 的表达与 LIHC 临床预后的关系, 并计算出 95%可信区间的危险比(HR)和对数等级 P 值。

2.3. 免疫浸润和相关免疫检查点分析

TIMER2 数据库(<http://timer.cistrome.org/>)分析靶基因表达与免疫细胞临床相关性的关系。在这项研究中, 我们研究了 GSDME 的 mRNA 表达与肿瘤浸润免疫细胞之间的相关性, 包括 B 细胞、CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、和自然杀伤细胞(NK)。我们还使用 TIMER2 探讨了 GSDME 表达与免疫检查点相关基因表达之间的相关性, 主要为程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1)-PDCD1、细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA4)和程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1)-CD274 基因。

2.4. GSDME 蛋白的免疫组织化学染色结果分析

为了观察 GSDME 蛋白在 LIHC 组织中的表达情况, 我们利用 HPA 蛋白图谱 (<https://www.proteinatlas.org/>), 观察 GSDME 蛋白的病理变化。这是研究蛋白质在人体组织和细胞中定位和表达的宝贵资源[15]。在我们的研究中, HPA011326 抗体用于染色, 免疫组织化学检测的蛋白表达水平分为强、中、弱或阴性。

3. 结果

3.1. GSDME 在肝细胞癌中表达上调

根据 Timer2.0 数据库的分析结果, 我们发现 GSDME mRNA 在多种癌症中都有上调表达, 包括胆管癌、头颈鳞状细胞癌、肾癌、肺鳞癌、胰腺癌和肝细胞癌(图 1)。为了验证数据库中的结果, 我们运用 GEPIA 和 UALCAN 进一步研究了 GSDME 在肝癌中的表达, 我们发现 GSDME mRNA 在癌组织中的表达显著高于癌旁组织(图 2(A)和图 2(B)), GSDME 的蛋白表达在肝癌细胞中的表达高于在正常肝组织中的表达(图 2(C))。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

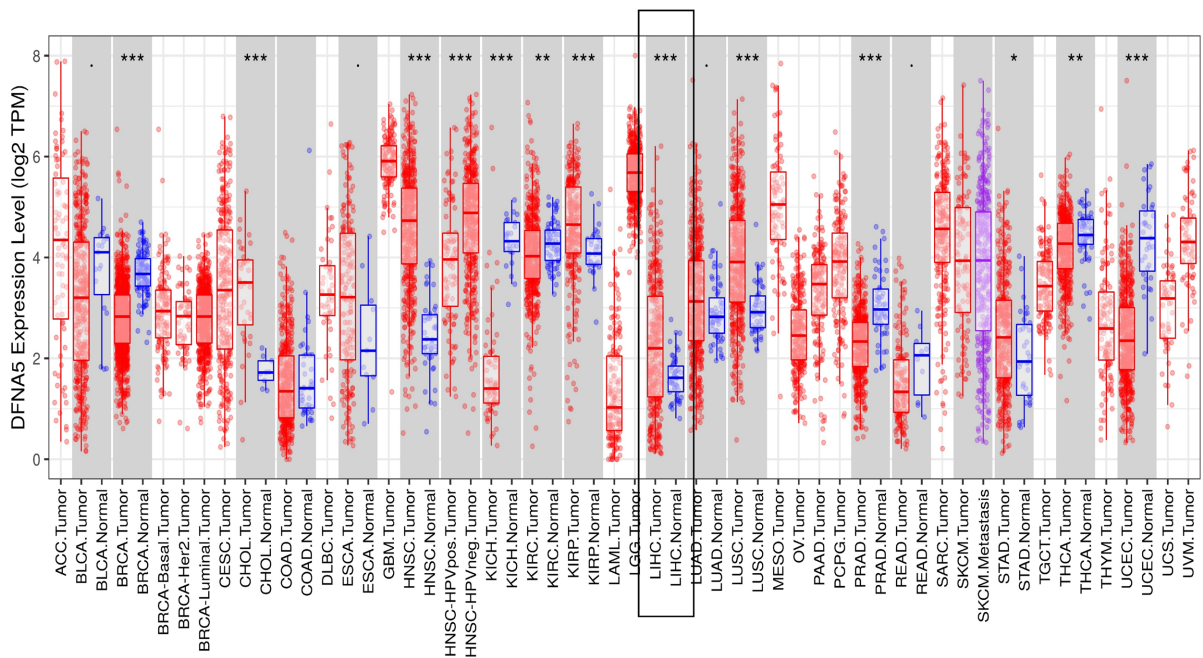


Figure 1. The expression map of GSDME gene in pan-cancer
图 1. GSDME 基因在泛癌中的表达图

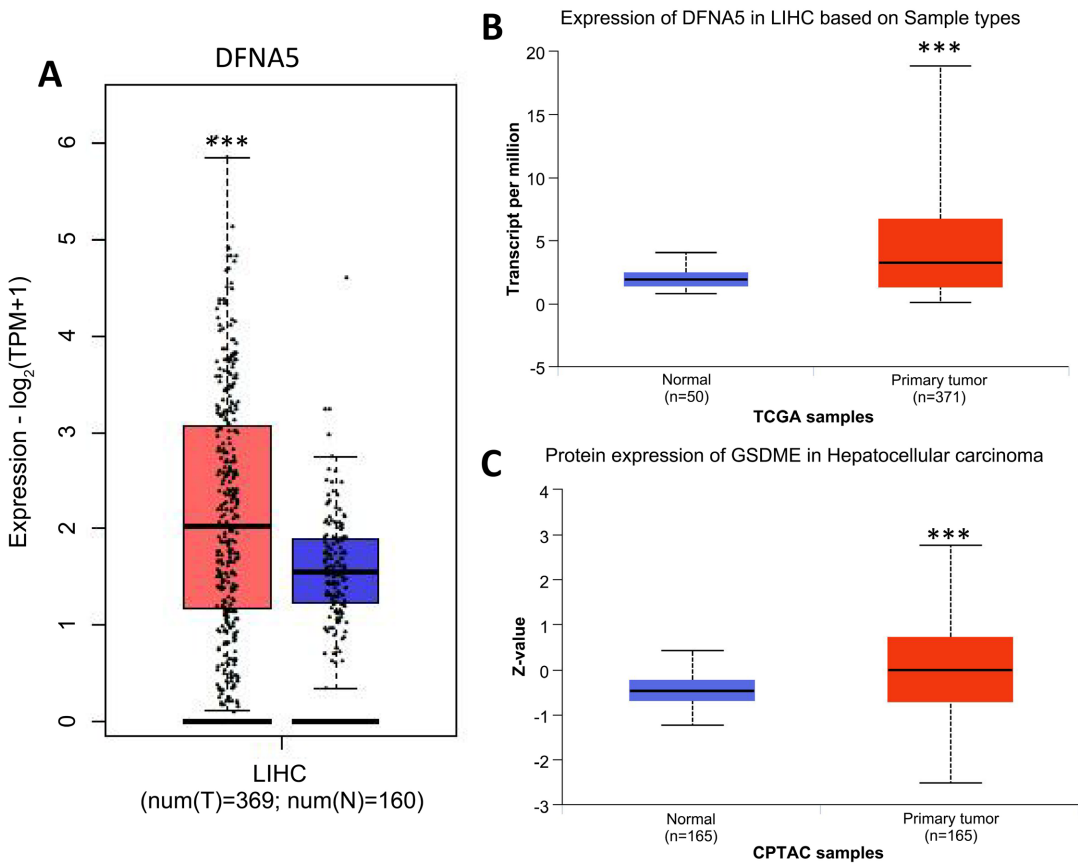


Figure 2. The expression map of GSDME gene in liver cancer
图 2. GSDME 基因在肝癌中的表达图

3.2. GSDME 表达与肝癌进展相关

随后, 利用 UALCAN 数据库分析, 发现 GSDME 的表达与肝癌的分级分期、TP53 突变和淋巴结转移状态显著相关(图 3)。以上结果均提示 GSDME 在肝细胞癌中异常表达, 可作为肝细胞癌进展的生物标志物。

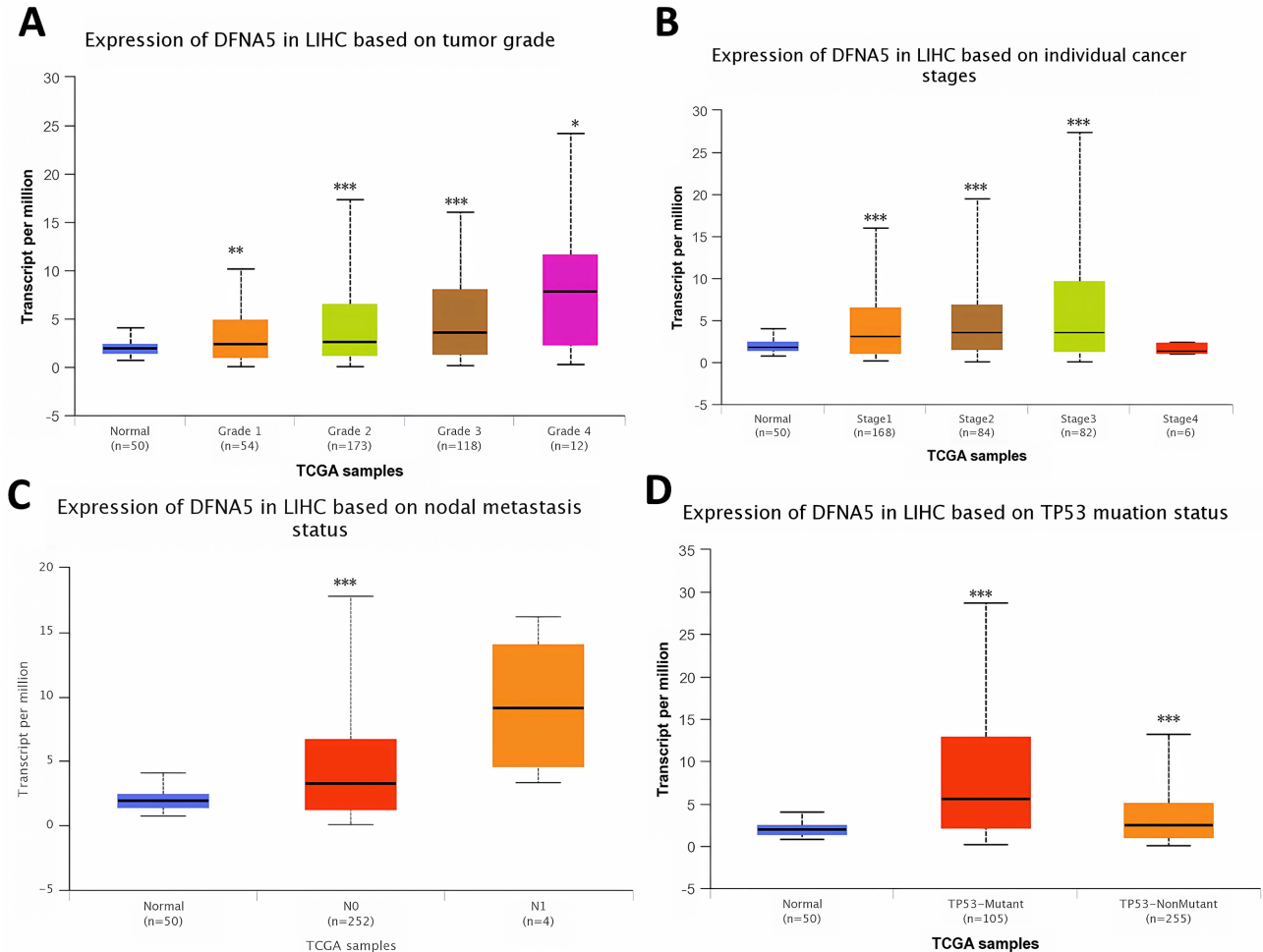


Figure 3. The expression map of GSDME gene in HCC subgroup stratification
图 3. GSDME 基因在 HCC 亚组分层中的表达图

3.3. GSDME 表达与肝癌患者预后密切相关

采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 GSDME 表达与肝癌患者临床预后的关系。结果表明, GSDME 的表达与肝癌的总生存期(OS)和疾病特异性生存期(DSS)显著相关($P < 0.05$), 然而, 它与无进展生存期(PFS)无显著相关($P > 0.05$) (图 4), 结果说明高表达 GSDME 的肝癌患者有着较短的总生存期(OS)和疾病特异性生存期(DSS)。

3.4. 肝细胞癌中 GSDME 的表达与免疫细胞浸润的强相关性

使用 TIMER2.0, 我们发现 GSDME 的表达与免疫细胞浸润显著相关(图 5)。免疫细胞的表达, 包括 B 细胞、自然杀伤(NK)细胞、CD4+T 细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和中性粒细胞。然而, GSDME 的

表达与 CD8+T 细胞的浸润无明显相关性。综上所述, GSDME 可能广泛参与肿瘤免疫细胞浸润, 在 HCC 的发生发展中起着至关重要的作用。

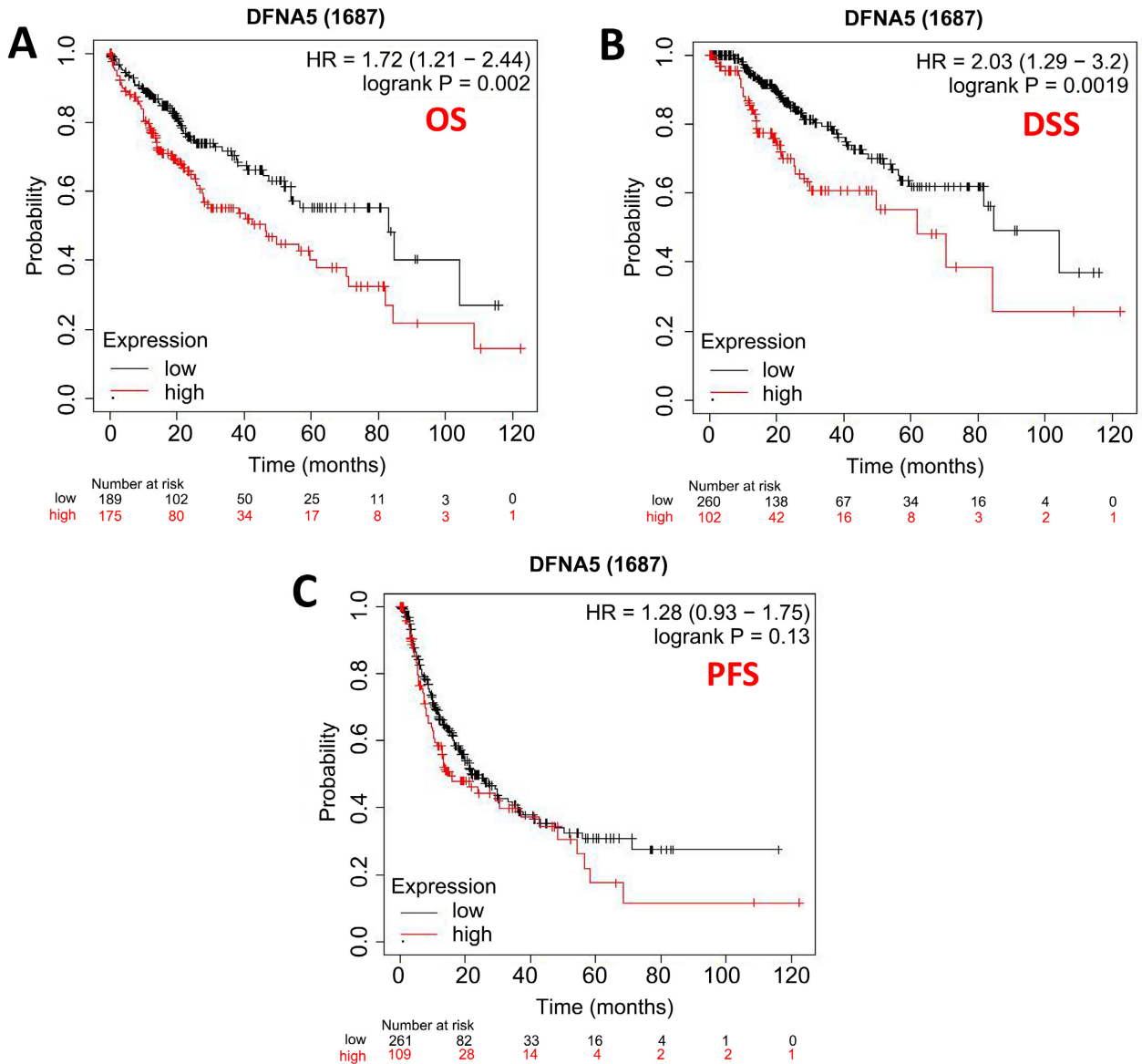
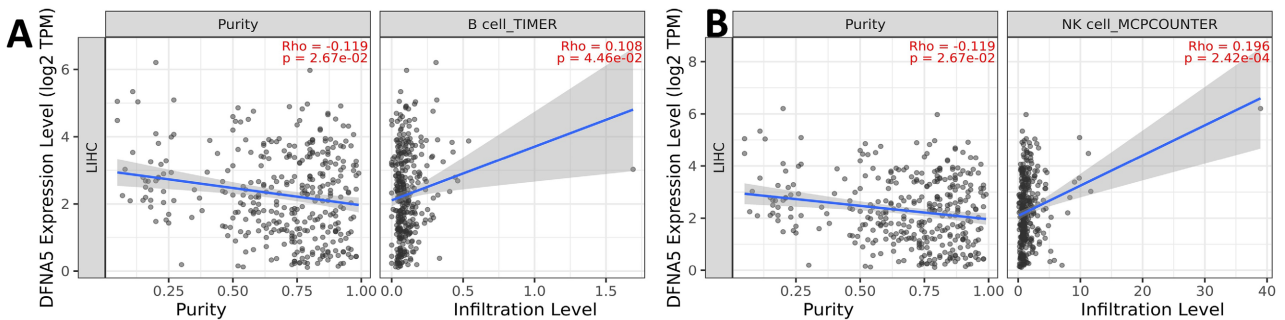


Figure 4. Survival curve analysis of GSDME gene expression and prognosis of liver cancer
图 4. GSDME 基因表达与肝癌预后意义的生存曲线分析图



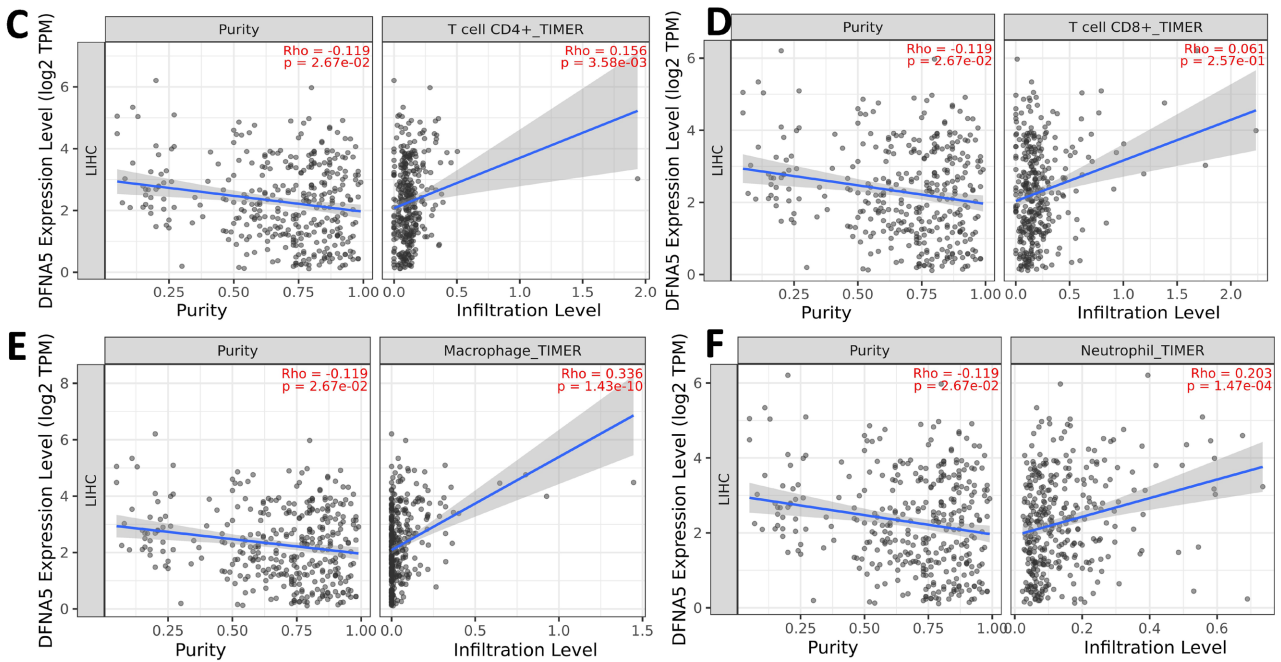


Figure 5. Correlation analysis between GSDME gene expression and HCC infiltrating immune cell marker gene expression
图 5. GSDME 基因表达与 HCC 浸润性免疫细胞标志基因表达的相关性分析

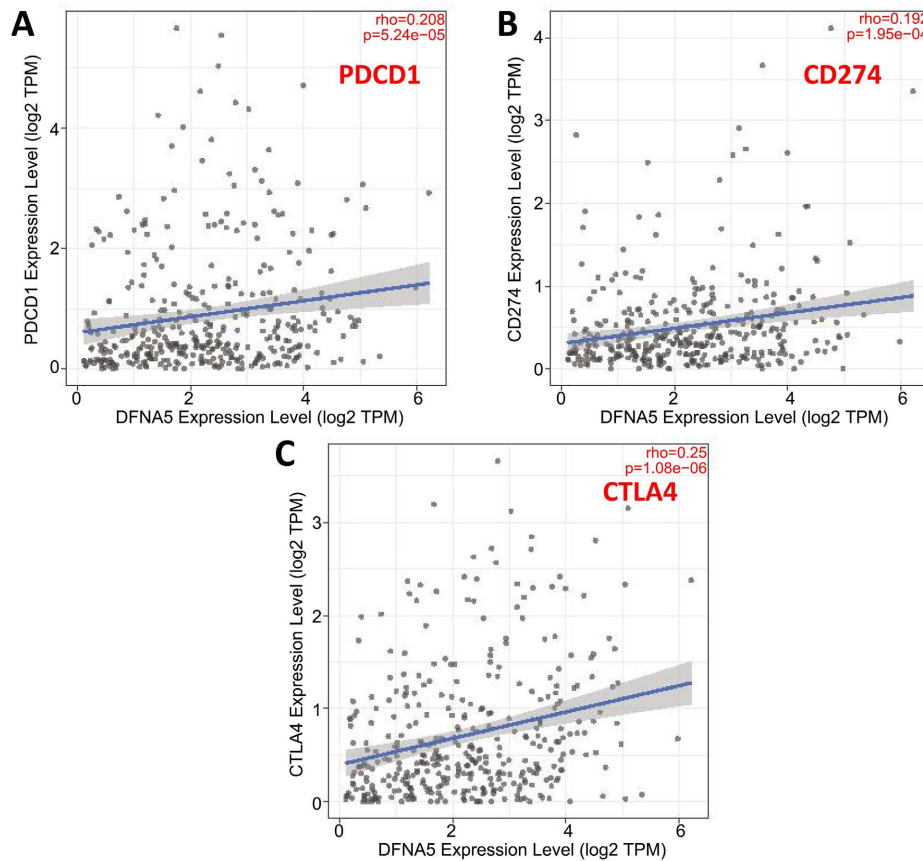


Figure 6. Correlation analysis between GSDME gene expression and tumor immune checkpoints
图 6. GSDME 基因表达与肿瘤免疫检查点的相关性分析

3.5. GSDME 表达与免疫检查点的相关性分析

为深入了解 GSDME 表达和免疫治疗相关检查点的相关性, 使用 TIMER2.0 数据库研究发现 GSDME 的表达与 PD-1 (PDCD1) ($P < 0.001$, $r = 0.208$)、PD-L1 (CD274) ($P < 0.001$, $r = 0.192$)、和 CTLA4 ($P < 0.001$, $r = 0.25$) 的表达是显著正性相关(spearman 分析)(图 6)。

3.6. 免疫组织化学(IHC)检测 GSDME 基因在肝癌中的蛋白表达

为进一步实验验证 GSDME 在肝癌患者组织的真实表达情况, 运用 HPA 数据库, 在我们的研究中, HPA011326 抗体用于免疫组织化学染色, 免疫组织化学检测的 GSDME 蛋白表达水平分为强、中、弱或阴性。我们发现 GSDME 在肝癌组织中呈强表达, 在正常的肝组织中呈弱表达(图 7), 这进一步证实 GSDME 蛋白的表达在肝癌的发展中起到重要的作用。

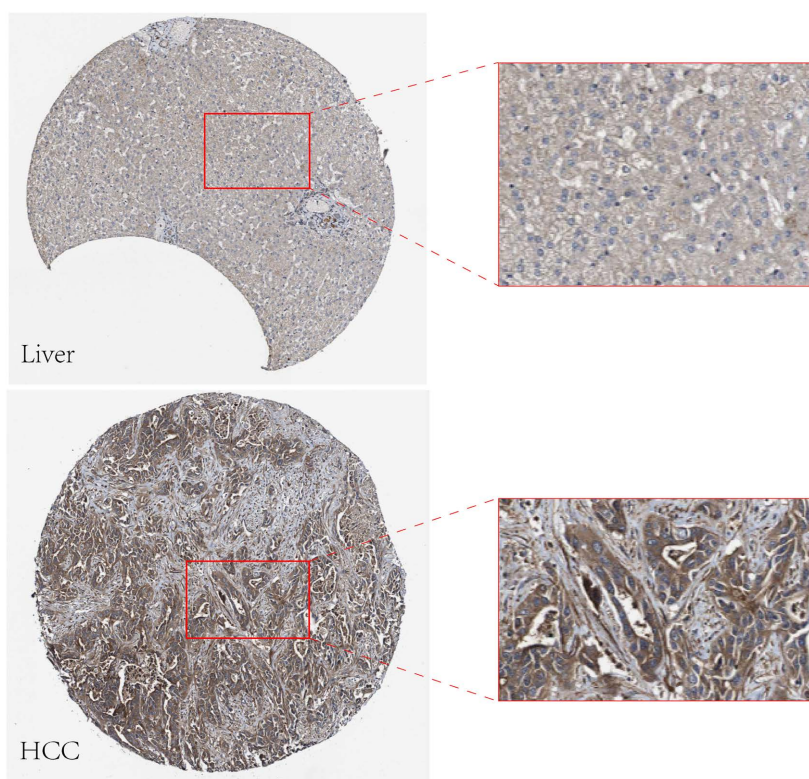


Figure 7. Protein expression of GSDME in HCC clinical samples
图 7. LIHC 临床样本中 GSDME 的蛋白表达

4. 讨论

越来越多的证据表明, 焦亡执行蛋白 GSDME (DFNA5) 参与了各种癌症类型的一系列生物学过程, 包括个体发育、体内外环境平衡和病理生理过程[16]。根据最新的文献报道, GSDME 的表达与人类疾病, 特别是与恶性肿瘤有着密切的关系。然而, GSDME 基因在肿瘤发病机制中的作用及其潜在的分子机制值得进一步研究, 特别是目前关于 GSDME 在肝癌中的研究甚少[17]。因此, 我们对 GSDME 的表达、预后、基因改变、免疫细胞浸润和可能的分子机制进行了全面分析。

先前的研究已经证明了 GSDME 在多种疾病中的作用, 例如多种肿瘤化疗药物被证明是通过 caspase3/GSDME 信号通路影响肝癌的进展[18]。在我们的研究中, 根据 GEPIA 数据库和 TCGA 数据库,

与肝脏正常样本相比, LIHC 具有更高水平的 GSDME 表达。LIHC 中上调的 GSDME 表达与晚期临床病理参数(组织分级、肿瘤分级和淋巴结转移)相关, 同时也与不良预后有关(OS), 表明 GSDME 可以作为肝癌预后的生物标志物。

免疫疗法彻底改变了肿瘤治疗的管理, 其机理主要是重新启动并维持肿瘤免疫循环以恢复正常的抗肿瘤免疫活性[19]。不幸的是, 目前, 免疫疗法仅使一部分患者受益, 其中一个原因是癌细胞可能有效地逃避由固有免疫抑制微环境引起的宿主免疫系统。对于 HCC, 近年来分子靶向治疗和免疫治疗发挥了一定的治疗作用[20]。例如, 免疫检查点抑制剂的开发已显示出临床疗效[21]。然而, 由于其有一定的副作用, 大多数 HCC 患者无法从免疫检查点抑制剂中获益。因此, 有必要进一步寻找免疫相关基因, 以改善 HCC 患者的预后。

据报道, 肝癌中 GSDME 水平显著升高, 并且与这些患者的不良预后有关, 这可能是由于肿瘤微环境中异常的免疫细胞浸润[22]。在本研究中, 相关性分析揭示了 GSDME 与 PD-L1 (CD274)、CTLA4、PD-1 (PDCD1)和免疫细胞(如巨噬细胞、B 细胞、NK 细胞、中性粒细胞、CD4+T 细胞等)。此外, 与 GSDME 的低表达组相比, 免疫细胞(巨噬细胞、B 细胞、NK 细胞、中性粒细胞、CD4+T 细胞)的富集在高表达组中更高。我们的结果表明, 在肝癌肿瘤的微环境中, GSDME 与免疫浸润和免疫抑制密切相关。综上所述, 我们提供了大量证据支持 GSDME 作为 HCC 早期预后生物标志物的临床应用。应更深入地研究有关用于 LIHC 治疗的 GSDME 相关通路的进一步分析。

然而, 尽管在整合现有 TCGA 数据库的信息方面做出了很多努力, 但目前的研究仍然存在一些局限性[23]。首先, 虽然生物信息学分析为我们提供了 GSDME 在癌症中的一些重要见解, 但有必要进行生物学研究体外或体内实验以检查我们的发现并加速临床应用。进一步的机理探索将有助于阐明 GSDME 在分子水平上的作用。其次, 翻译后修饰在调节细胞内信号转导和调节因子的活性方面具有重要价值, 但这些数据库中并没有 GSDME 的翻译后修饰数据。第三, 发现 GSDME 表达与癌症免疫和临床生存预后相关; 然而, 我们不确定 GSDME 通过明确的信号通路影响临床生存。

因此, 我们才刚刚开始了解 GSDME 的分子机制及其在肝癌研究中的新兴作用, 需要做大量的工作来进一步拓宽 GSDME 在人类癌症中的应用。

基金项目

广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF202328); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20210959)。

参考文献

- [1] Llovet, J., Zucman-Rossi, J., Pikarsky, E., *et al.* (2016) Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, **2**, Article No. 16018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.18>
- [2] Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., *et al.* (2019) Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *International Journal of Cancer*, **144**, 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- [3] McGlynn, K.A., Petrick, J.L. and El-Serag, H.B. (2021) Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **73**, 4-13. <https://doi.org/10.1002/hep.31288>
- [4] Ding, J. and Wen, Z. (2021) Survival Improvement and Prognosis for Hepatocellular Carcinoma: Analysis of the SEER Database. *BMC Cancer*, **2**, Article No. 1157. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08904-3>
- [5] Yu, P., Zhang, X., Liu, N., *et al.* (2021) Pyroptosis: Mechanisms and Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6**, Article No. 128. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>
- [6] Wang, Y., Gao, W., Shi, X., *et al.* (2017) Chemotherapy Drugs Induce Pyroptosis through Caspase-3 Cleavage of a Gasdermin. *Nature*, **547**, 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>

- [7] Xia, X., Wang, X., Cheng, Z., *et al.* (2019) The Role of Pyroptosis in Cancer: Pro-Cancer or Pro-“Host”? *Cell Death & Disease*, **10**, Article No. 650. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1883-8>
- [8] Zhang, X., Zhang, P., An, L., *et al.* (2020) Miltirone Induces Cell Death in Hepatocellular Carcinoma Cell through GSDME-Dependent Pyroptosis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **10**, 1397-1413. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.06.015>
- [9] Shangguan, F., Zhou, H., Ma, N., *et al.* (2021) A Novel Mechanism of Cannabidiol in Suppressing Hepatocellular Carcinoma by Inducing GSDME Dependent Pyroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, Article 697832. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.697832>
- [10] Chen, X., Yang, M., Wang, L., *et al.* (2023) Identification and *in Vitro* and *in Vivo* Validation of the Key Role of GSDME in Pyroptosis-Related Genes Signature in Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*, **23**, Article No. 411. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10850-1>
- [11] Li, T., Fan, J., Wang, B., *et al.* (2017) TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *Cancer Research*, **77**, e108-e110. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0307>
- [12] Tang, Z., Li, C., Kang, B., *et al.* (2017) GEPIA: A Web Server for Cancer and Normal Gene Expression Profiling and Interactive Analyses. *Nucleic Acids Research*, **45**, W98-W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- [13] Chandrashekar, D.S., Bashel, B., Balasubramanya, S.A.H., *et al.* (2017) UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*, **19**, 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- [14] D’Arrigo, G., Leonardis, D., Elhafeez, S.A., *et al.* (2021) Methods to Analyse Time-to-Event Data: The Kaplan-Meier Survival Curve. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**, Article ID: 2290120. <https://doi.org/10.1155/2021/2290120>
- [15] Digre, A. and Lindskog, C. (2021) The Human Protein Atlas-Spatial Localization of the Human Proteome in Health and Disease. *Protein Science*, **30**, 218-233. <https://doi.org/10.1002/pro.3987>
- [16] Wang, Y.-Y., Liu, X.-L. and Zhao, R. (2019) Induction of Pyroptosis and Its Implications in Cancer Management. *Frontiers in Oncology*, **9**, Article 971. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00971>
- [17] Li, Y., Zhao, R., Xiu, Z., *et al.* (2023) Neobavaisoflavone Induces Pyroptosis of Liver Cancer Cells via Tom20 Sensing the Activated ROS Signal. *Phytomedicine*, **116**, Article ID: 154869. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154869>
- [18] Zheng, Z., Bian, Y., Zhang, Y., Ren, G. and Li, G. (2020) Metformin Activates AMPK/SIRT1/NF- κ B Pathway and Induces Mitochondrial Dysfunction to Drive Caspase3/GSDME-Mediated Cancer Cell Pyroptosis. *Cell Cycle*, **19**, 1089-1104. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1743911>
- [19] Rao, G., Latha, K., Ott, M., *et al.* (2020) Anti-PD-1 Induces M1 Polarization in the Glioma Microenvironment and Exerts Therapeutic Efficacy in the Absence of CD8 Cytotoxic T Cells. *Clinical Cancer Research*, **26**, 4699-4712. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-4110>
- [20] Donne, R. and Lujambio, A. (2023) The Liver Cancer Immune Microenvironment: Therapeutic Implications for Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **77**, 1773-1796. <https://doi.org/10.1002/hep.32740>
- [21] Loveless, R., Bloomquist, R. and Teng, Y. (2021) Pyroptosis at the Forefront of Anticancer Immunity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **40**, Article No. 264. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02065-8>
- [22] Xu, H., Zhang, D., Wei, R., *et al.* (2022) Gambogic Acid Induces Pyroptosis of Colorectal Cancer Cells through the GSDME-Dependent Pathway and Elicits an Antitumor Immune Response. *Cancers*, **14**, Article No. 5505. <https://doi.org/10.3390/cancers14225505>
- [23] Sun, X., Zhong, X., Ma, W., *et al.* (2022) Germacrone Induces Caspase-3/GSDME Activation and Enhances ROS Production, Causing HepG2 Pyroptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **24**, Article No. 456. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11383>