



Empagliflozin Oral Squamöz Hücreli Karsinomada SLC2A3 ve NLRP3 İfadesini Baskılayarak Proliferasyonu ve Migrasyonu Engeller

Empagliflozin Inhibits OSCC Proliferation and Migration by Suppressing SLC2A3 and NLRP3

© Gülçin TEZCAN

Bursa Uludağ Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

Öz

Amaç: Oral squamöz hücreli karsinom (OSCC), ilerlemesi için yüksek glikoz metabolizması ve enflamasyona bağımlıdır. Glukoz taşıyıcı çözücü taşıyıcı ailesi 2 üyesi 3 (SLC2A3), kötü prognoz ile ilişkilidir, nükleotid bağlayıcı oligomerleşme bölgesi, lösin-zengin tekrar içeren aile pirin domain içeren 3 (NLRP3) ise kronik iltihaplanmaya katkı sağlar. Bu çalışma, antidiabetik ilaç empagliflozinin (emp) OSCC'de SLC2A3 ve NLRP3 üzerindeki düzenleyici etkilerini ve kanser hücresi büyümesi üzerindeki etkilerini araştırmaktadır.

Gereç ve Yöntem: İnsan OSCC hücre hatları SCCL-MT1 ve UPSI-SCC-131, suplementlerle zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium'de kültüre edilmiştir. Lipopolisakkarit maruziyeti ile enflamasyon modellenmiş ve adenosin trifosfat ile enflamazom aktivasyonu sağlanmıştır. Emp tedavi için kullanılmıştır. SLC2A3 ve NLRP3 ifadeleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir. Enzim bağlantılı immüno sorbent testi, interlökin-1 beta (IL-1 β) düzeylerini ölçerken, hücre proliferasyonu xCELLigence sistemi ile değerlendirilmiştir. Migrasyon sıyrık yara testi ile değerlendirilmiştir. Protein-protein etkileşimleri STRING veritabanı kullanılarak tahmin edilmiştir. İstatistiksel analiz GraphPad Prism ile yapılmıştır.

Bulgular: Emp, bir SGLT2 inhibitörü olarak, SCCL-MT1 ve UPSI-SCC131 OSCC hücre hatlarında SLC2A3 (sırasıyla $p < 0,0001$, $p = 0,0002$) ve NLRP3 ekspresyonunu (sırasıyla $p = 0,0008$; $p = 0,0006$) anlamlı düzeyde azaltmış; bu da IL-1 β salınımlarında (sırasıyla $p = 0,0190$, $p < 0,0001$), hücre proliferasyonunda (sırasıyla $p = 0,024$; $p < 0,0001$) ve migrasyonunda (sırasıyla $p = 0,0021$; $p = 0,0004$) azalmaya yol açmıştır. Bu bulgular, glukoz metabolizması ve enflamasyonu hedef alarak OSCC tedavisinde Emp'in potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç: Bulgularımız, emp'nin SLC2A3 ve NLRP3 ifadesini ve IL-1 β salınımlarını inhibe ederek OSCC'de glukoz metabolizması ve enflamasyonu etkin bir şekilde modüle ettiğini, böylece kanser hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azalttığını ve OSCC ilerlemesinin kontrolü için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Oral squamöz hücreli karsinom, SLC2A3, NLRP3, empagliflozin

ABSTRACT

Aim: High glucose and inflammation facilitate oral squamous cell carcinoma (OSCC) progression. The glucose transporter solute carrier family 2 member 3 (SLC2A3) and the nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat-containing family pyrin domain containing 3 (NLRP3), contribute to chronic inflammation and poor prognosis. This study investigates the regulatory effects of the antidiabetic drug empagliflozin (emp) on SLC2A3 and NLRP3 in OSCC and their impact on cancer cell growth.

Materials and Methods: Human OSCC cell lines, SCCL-MT1 and UPSI-SCC-131, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium with supplements. Emp, lipopolysaccharide, and adenosine triphosphate were used for treatments. Real-time polymerase chain reaction quantified SLC2A3 and NLRP3 expressions. Enzyme-linked immunosorbent assay measured interleukin-1beta (IL-1 β) levels, and cell proliferation was assessed using the xCELLigence system. Migration was evaluated via a scratch wound assay. Protein-protein interactions were predicted using the STRING database. Data analysis was conducted using GraphPad Prism.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Gülçin TEZCAN, Bursa Uludağ Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

E-posta: gulgintezcan@uludag.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-5956-8755

Geliş Tarihi/Received: 04.03.2025 **Kabul Tarihi/Accepted:** 25.06.2025 **Yayınlanma Tarihi/Publication Date:** 07.10.2025

Atıf/Cite this article as: Tezcan G. Empagliflozin inhibits OSCC proliferation and migration by suppressing SLC2A3 and NLRP3. Nam Kem Med J. 2025;13(3):302-310



Results: Emp, an SGLT2 inhibitor, significantly reduced SLC2A3 ($p<0.0001$, $p=0.0002$; respectively) and NLRP3 expression ($p=0.0008$; $p=0.0006$; respectively), leading to decreased IL-1 β release ($p=0.0190$, $p<0.0001$; respectively), proliferation ($p=0.024$; $p<0.0001$; respectively), and migration ($p=0.0021$; $p=0.0004$, respectively) in SCCL-MT1 and UPSI-SCC131 OSCC cell lines. These findings suggest emp's potential as a therapeutic agent for OSCC by targeting glucose metabolism and inflammation.

Conclusion: These findings suggest that emp effectively modulates glucose metabolism and inflammation in OSCC by inhibiting SLC2A3 and NLRP3 expression and IL-1 β release, thereby reducing cancer cell proliferation and migration, highlighting its possible role as a treatment option for managing OSCC progression.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, SLC2A3, NLRP3, empagliflozin

GİRİŞ

Yüksek glikoz metabolizması ve enflamatuvar süreçler, oral skuamöz hücreli karsinomda (OSCC) tümör büyümesini, metastazı ve tedaviye direnci kolaylaştıran iki ana faktördür¹. Kanser hücreleri, özellikle oksidatif fosforilasyon tek başına enerji üretimini sürdüremezken, hipoksi, besin kıtlığı ve asidik pH gibi hızlı mikroçevresel değişikliklere uyum sağlamalıdır. Bunu telafi etmek için, yeterli adenosin trifosfat (ATP) üretimi sağlamak ve hücre çoğalması için gerekli biyosentetik talepleri karşılamak üzere glikoz metabolizmasını yeniden programlarlar^{2,3}. Bu metabolik değişim, kanser hücrelerinin aerobik glikoliz yoluyla ATP ve biyosentetik öncüller üretmesini sağlar ve bu da yüksek proliferatif tümör hücrelerinde glikoz alımının önemli ölçüde artmasına yol açar^{3,4}. Bu adaptasyon, kanser hücresi proliferasyonu için gerekli substratları sağlar ve tümörün ilerlemesi, metastaz ve uzun süreli sağkalıma katkıda bulunur^{4,5}.

Ek olarak, kanser hücrelerinde yüksek glikoz seviyeleri, reaktif oksijen türlerini indükleyebilir ve bu da sonuç olarak nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı, lösin bakımından zengin tekrar içeren aile pirin alanı içeren 3 (NLRP3) gibi sitoplazmik multiprotein komplekslerinin oluşumunu tetikler⁶. Enflammasom olarak bilinen bu protein kompleksi, proenflamatuvar interlökin-1 beta (IL-1 β) gibi sitokin salgılanmasını teşvik ederek ve bunları hücre dışı boşluğa salarak enflamatuvar yanıtları aktive eder ve böylece hücrel enflamasyonu yoğunlaştırır⁷.

Kanser hücrelerinin metabolik yeniden programlanması, glikoz taşıyıcılar (GLUT) dahil olmak üzere metabolik enzimlerin ekspresyonunu kontrol eden hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α tarafından düzenlenir^{8,9}. Bu metabolik bağımlılık göz önüne alındığında, glikoz metabolizmasını hedeflemek, terapötik etkinliği artırmak için umut verici bir yaklaşım sunar^{10,11}. GLUT ailesi içinde GLUT3, özellikle hayatta kalmak için yüksek glikoz afinitesi gerektiren hücrelerde bazal glikoz taşınmasını sürdürmede önemli bir rol oynar¹². OSCC tümörlerinde, taşıyıcı çözücü taşıyıcı ailesi 2 üyesi 3 (SLC2A3) geni tarafından

kodlanan GLUT3 ekspresyonu, glikoz metabolizmasının artması nedeniyle kötü prognoz ve agresif kanser fenotipi ile ilişkilendirilmiştir^{13,14}. Ayrıca, OSCC'de NLRP3 ekspresyonunun artması, tümör ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir¹⁵.

Bu bulgular ışığında, antidiabetik ilaçların kanser hücresi metabolizmasını ve enflamatuvar yanıtları modüle etme potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmalar, metformin dahil antidiabetik ilaçların antikanser etkilerini vurgulamış olsa da, empagliflozin (emp) gibi sodyum-glukoz kotransporter-2 inhibitörlerinin kanser tedavisinde rolü hala yeterince anlaşılmamıştır¹⁶⁻¹⁹. Emp'nin obezite modellerinde NLRP3'ü baskıladığı bildirilmiş olsa da²⁰, kanserde NLRP3 ekspresyonu üzerindeki etkisi büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada emp'nin GLUT3'ü kodlayan SLC2A3 ve OSCC hücre hatlarında NLRP3 üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ek olarak, OSCC hücre proliferasyonunda emp aracılı SLC2A3-NLRP3 modülasyonunun rolü araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücreler ve Reaktifler

İnsan ağız boşluğu skuamöz hücreli karsinom hücre hattı SCCL-MT1, (Bursa Üniversitesi) tarafından cömertçe sağlanmış olup, UPSI-SCC-131 OSCC hücre hattı ise (Bursa Üniversitesi) tarafından hediye edilmiştir. Hücreler, fetal sığır serumu (%10), antibiyotik çözeltisi (penisilin ve streptomisin, 50 U/mL), L-glutamin (2 mM) ve sodyum piruvat (1 mM) ile takviye edilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium-yüksek glikoz ortamında kültürlendi ve standart kültür koşullarında (37 °C, %5 CO₂, nemlendirilmiş atmosfer) muhafaza edildi. Tüm deneyler 15. pasaj hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü ortamı HyClone (Logan, UT, ABD) tarafından temin edilirken, takviyeler BIOCHROME (Berlin, Almanya) tarafından sağlanmıştır. Escherichia coli O111:B4'ten lipopolisakkarit (LPS) Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından, ATP InvivoGen (San Diego, CA, ABD) firmasından, emp ise Boehringer Ingelheim (Biberach, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Toplam RNA, Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Orange, CA, ABD) ile izole edildi. RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, Beckman Coulter DU 730 spektrofotometresi (Brea, CA, ABD) ile A260/280 ve A260/230 oranları analiz edilerek değerlendirildi. Ters transkripsiyon için ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) kullanılmıştır. SLC2A3'ün ekspresyon seviyesi TaqMan™ Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak analiz edilirken, NLRP3 ekspresyonu Tezcan ve ark.²¹ tarafından bildirilen primerler ile analiz edilmiştir. Beta-aktin (ACTB), normalizasyon için referans gen olarak kullanılmıştır²¹. SLC2A3 için kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) reaksiyonu, üreticinin talimatlarına göre TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. NLRP3 ve ACTB için qPCR, 200 ng cDNA, her primerden 10 µM ve Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) içeren 10 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Kantitatif PCR, StepOnePlus™ gerçek zamanlı-PCR sistemi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) üzerinde aşağıdaki döngü koşullarında gerçekleştirildi: 95 °C'de 2 dakika ilk denatürasyon, ardından 95 °C'de 10 saniye denatürasyon ve 56 °C'de 60 saniye annealing/uzatma olmak üzere 40 döngü. Ct değeri belirleme ve kat değişim hesaplamaları dahil olmak üzere veri analizi, StepOnePlus™ yazılımı ve $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her karşılaştırma grubu için, her biri teknik olarak iki kez analiz edilen üç bağımsız biyolojik replikat ile deneyler gerçekleştirilmiştir.

Enzim Bağlı İmmünoabsorben Testi (ELISA)

Hedef IL-1β'ye özgü biyotin etiketli bir tespit antikorunu kullanarak sandviç ELISA yaklaşımı (SunRed Bio, Şangay, Çin) uygulanmıştır. Numuneler ve standartlar, 37 °C'de 1 saat boyunca önceden yakalama antikorunu ile kaplanmış kuyucuklarda inkübe edilmiş, ardından fosfat tamponlu salin (PBS) ile üç kez yıkanmıştır. Biyotin etiketli tespit antikorunu eklenerek 30 dakika inkübe edildi, ardından streptavidin-yaban turpu peroksidazı konjugatı eklendi. Karartılmış ortamda substrat çözeltisi ile 30 dakika inkübe edildikten sonra, mikrolaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de (referans: 650 nm) renk gelişimi ölçüldü. Her karşılaştırma grubu, teknik olarak iki kez tekrarlanarak üç biyolojik tekrar ile analiz edildi. Bulgular, IL-1β referans standartlarından oluşturulan standart eğriye göre hesaplandı.

Dinamik Hücre Proliferasyon Analizi

SCCL-MT1 ve UPSI-SCC-131 hücreleri (kuyu başına 5×10^4) bir E-Plate 16 (ACEA Biosciences, San Diego, CA, ABD) içine yerleştirildi. Hücre büyümesi, hücre canlılığı ve

proliferasyonunun bir göstergesi olarak elektriksel empedansı ölçen xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) çift amaçlı sistemi (ACEA Biosciences, San Diego, CA, ABD) kullanılarak 96 saat boyunca her 30 dakikada bir sürekli olarak izlendi. Doğru normalizasyon sağlamak için hücre ekmeden önce arka plan empedansı kaydedildi. İki farklı hücre hattının her biri için, deney karşılaştırma grubu başına üç bağımsız biyolojik replikat ile gerçekleştirildi. Ortaya çıkan proliferasyon eğrileri, RTCA Yazılımı (ACEA Biosciences) kullanılarak oluşturulmuş ve analiz edilmiştir.

İn vitro Yara İyileşme Çizik Testi

Hücre göçünü görselleştirmek için çizik yara iyileşme testi yapılmıştır. Tek tabaka birleşince, 1000 µL pipet ucu kullanılarak çizik atılmış ve standart bir yara alanı oluşturulmuştur. Ayrılan hücreler ve kalıntılar, fosfat PBS ile yıkayarak dikkatlice temizlendi. Yaralı bölgenin görüntüleri, çizilmeden sonra ve tedaviden 24 saat sonra ters mikroskop (Nikon, Tokyo, Japonya) kullanılarak kaydedildi. Yara kapanması, ImageJ v1.54f yazılımı (National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) kullanılarak her iki zaman noktasında yara alanını ölçerek nicelendirildi. Deney, karşılaştırma grubu başına üç biyolojik replikatta gerçekleştirildi ve tekrarlanabilirliği sağlamak için her replikat teknik olarak iki kez analiz edildi.

İstatistiksel Analiz

Protein-protein etkileşimleri STRING v12.0 (<https://string-db.org/>) (erişim tarihi 24 Şubat 2025) kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz GraphPad Prism (v14.4.0) (GraphPad Software, Boston, MA, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılım izlediği Q-Q plot analizi ve Shapiro-Wilk testleri ile doğrulanmış, $p > 0,05$ normallikten önemli bir sapma olmadığını göstermiştir. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Grup farklılıkları tek yönlü ANOVA ile analiz edildi, ardından çoklu testlerden kaynaklanan Tip I hata artışını kontrol etmek için çiftli karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi uygulandı. Bulgular, ortalama $\pm$ standart hata olarak rapor edildi ve anlamlılık $p < 0,05$ olarak tanımlandı. Tüm istatistiksel testler, verilerin sağlamlığını ve tekrarlanabilirliğini sağlamak için en az üç bağımsız biyolojik replikat ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

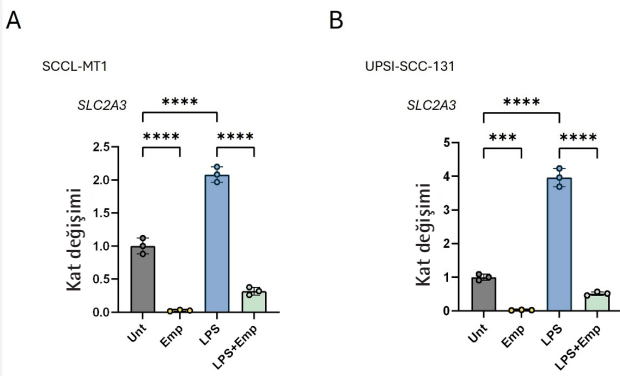
Empagliflozin, OSCC Hücrelerinde SLC2A3 Ekspresyonunu Bastırdı

Enflamasyon kaynaklı OSCC hücre modeli oluşturmak için, SCCL-MT1 ve UPSI-SCC131 hücreleri 3 saat boyunca 1 µg/mL LPS'ye maruz bırakıldı²². Ek olarak, hücreler, önceki çalışmamızda¹⁹ tarif edildiği gibi glikoz taşınmasını baskılama amacıyla 24 saat boyunca 500 nM Emp, bir SGLT2 inhibitörü

ile muamele edildi. Bulgularımız, emp'nin hem SCCL-MT1 ($p<0,0001$) hem de UPSI-SCC131 hücrelerinde ($p=0,0002$) SLC2A3 RNA ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını gösterdi. Dahası, LPS ile indüklenen hücrelerde, daha sonra Emp'ye maruz kaldıklarında, sadece LPS ile tedavi edilen hücelere kıyasla SLC2A3 ekspresyonu daha da azaldı ($p<0,0001$) (Şekil 1A, B).

Empagliflozin, LPS ile İndüklenen Enflamasyonda NLRP3 Ekspresyonunu Azalttı ve IL-1 β Salınımını Baskıladı

Genetik etkileşim analizi, hem SLC2A3 hem de NLRP3'ün IL-1 β ile etkileşime girdiğini öngörmüştür (Şekil 2A). Bu bulguları destekleyen Emp, SCCL-MT1 ($p=0,0008$) ve UPSI-SCC131 hücrelerinde ($p=0,0006$) NLRP3 ekspresyonunu azaltmıştır (Şekil 2B, C). Benzer şekilde, LPS ile tedavi edilen SCCL-MT1 ve UPSI-SCC131 hücrelerinde, emp tedavisi, sadece LPS ile tetiklenen hücelere göre NLRP3 ekspresyonunda bir azalmaya yol açtı ($p<0,0001$). Emp'nin enflammasom aktivasyonu üzerine IL-1 β salınımı üzerindeki etkisini değerlendirmek için, hücreler 3 saat boyunca 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS ile tedavi edildi, ardından 24 saat emp tedavisi ve 25 dakika 5 mM ATP'ye maruz bırakıldı (Şekil 2D). IL-1 β salımı, enflammasom aktive edilmiş hücrelerde LPS ile indüklenen enflamasyon koşullarındaki hücelere kıyasla önemli ölçüde artmıştır ($p<0,0001$). Ancak Emp, LPS ile tedavi edilen hücrelerde (SCCL-MT1: $p=0,0190$; UPSI-SCC131) ($p<0,0001$) ve LPS-ATP tedavisi uygulanan enflammasom aktive hücrelerde ($p<0,0001$) (Şekil 2E, F), bu da Emp'in SLC2A3'ü inhibe ederek NLRP3 aracılı enflamatuvar sitokin üretimini de azaltabileceğini düşündürmektedir.

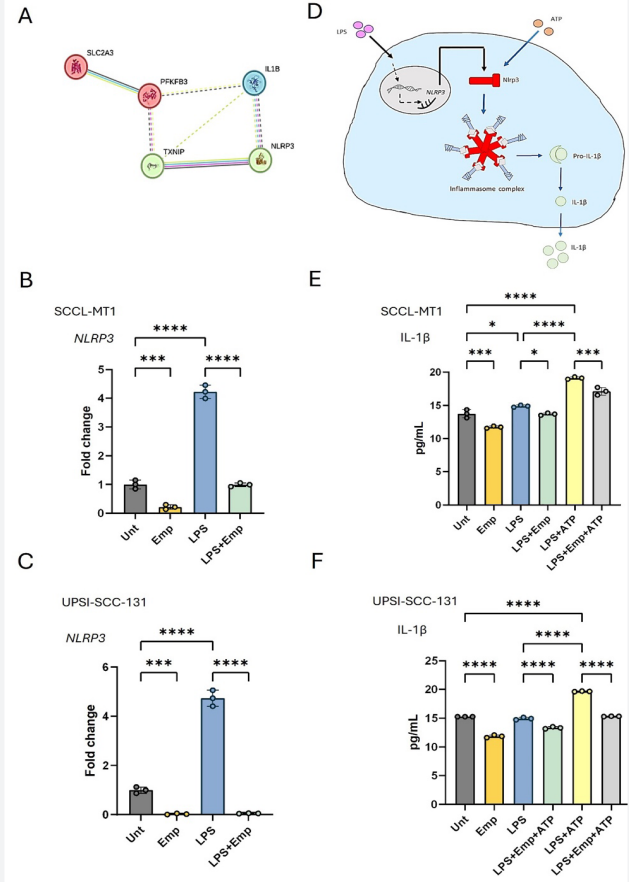


Şekil 1. Emp'nin OSCC hücrelerinde SLC2A3 ekspresyonu üzerindeki etkisi. (A) SCCL-MT1 hücreleri, (B) UPSI-SCC131 hücreleri. Unt ve emp ile LPS ve emp+LPS arasında karşılaştırma yapılmıştır. Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterilmiştir *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$

Unt: Tedavi edilmemiş, LPS: Lipopolisakkarit, emp: Empagliflozin, OSCC: Oral squamöz hücreli karsinom

Empagliflozin, OSCC Hücrelerinde Hücre Çoğalmasını ve Göçünü Yavaşlattı

Emp tedavisi, hem SCCL-MT1 hem de UPSI-SCC131 hücre hatlarının çoğalmasını azalttı (Şekil 3A, B). Buna karşın, LPS tedavisi, tedavi uygulanmayan kontrollere kıyasla hücre

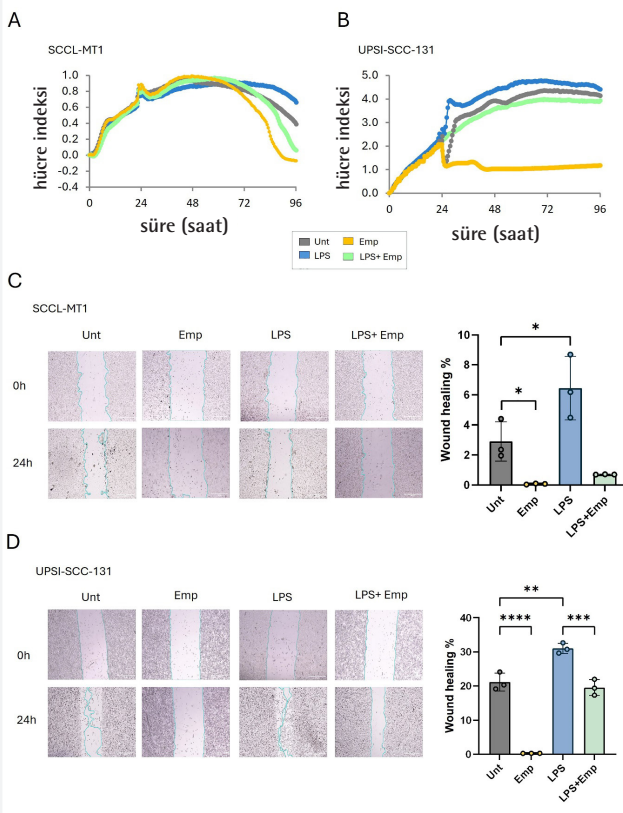


Şekil 2. Emp'nin OSCC hücrelerinde NLRP3 inflammasom üzerindeki etkisi. (A) SLC2A3, NLRP3 ve IL-1 β arasındaki etkileşim. (B) SCCL-MT1 hücrelerinde ve (C) UPSI-SCC131 hücrelerinde NLRP3 ekspresyonu. (D) LPS ve ATP maruziyetinin in vitro olarak NLRP3 transkripsiyonunu ve enflammasom kompleks oluşumunu nasıl etkilediğinin şematik gösterimi. (E) SCCL-MT1 hücrelerinden ve (F) UPSI-SCC131 hücrelerinden IL-1 β salımı. Emp, LPS ve LPS+ATP grupları Unt (kontrol) grubu ile karşılaştırılmıştır. Enflamatuvar koşullar altında emp'nin etkisini değerlendirmek için emp+LPS ve emp+LPS+ATP grupları LPS ile karşılaştırılmıştır. RT-qPCR analizi için sadece emp+LPS ve LPS arasındaki karşılaştırma yapılmıştır. Sadece istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterilmiştir. * $p<0,05$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

Unt: Tedavi edilmemiş, LPS: Lipopolisakkarit; ATP: Adenosin trifosfat, emp: Empagliflozin, OSCC: Oral squamöz hücreli karsinom, IL-1 β : İnterlökin-1 beta, RT-qPCR: Ters transkripsiyon kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

çoğalmasını artırdı. Ancak emp tedavisi, LPS ile önceden tedavi edilmiş hücrelerde, sadece LPS ile tedavi edilen hücrelere kıyasla çoğalmayı da inhibe etti (Şekil 3A, B).

Yara iyileşme testleri bu bulguları daha da destekleyerek, emp'nin hem SCCL-MT1 ($p=0,024$) hem de UPSI-SCC131 hücrelerinde ($p<0,0001$) hücre göçünü azalttığını gösterdi (Şekil 3C, D). Buna karşılık, LPS göçü artırarak hücre hareketini hızlandırdı (Şekil 3C, D). Özellikle, Emp, LPS ile önceden tedavi edilmiş hücrelerde de yara iyileşmesini azalttı (SCCL-MT1: $p=0,0021$; UPSI-SCC131: $p=0,0004$) (Şekil 3C, D). Bu bulgular, emp aracılı SLC2A3 ve NLRP3'ün baskılanmasının OSCC hücrelerinin büyüme hızını ve invaziv potansiyelini azalttığını ve agresif kanser hücresi davranışında bir azalmaya yol açtığını göstermektedir.



Şekil 3. Emp'nin OSCC hücre hareketliliği üzerindeki etkisi. (A) SCCL-MT1 hücrelerinin ve (B) UPSI-SCC131 hücrelerinin gerçek zamanlı proliferasyonu. (C) SCCL-MT1 hücrelerinde ve (D) UPSI-SCC131 hücrelerinde çizik yaraların iyileşmesi. Unt ve Emp ve Unt ve LPS grupları arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Ayrıca, enflamatuvar koşullar altında emp'nin etkisini değerlendirmek için emp+LPS ile LPS karşılaştırılmıştır. Yalnızca istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$

Unt: Tedavi uygulanmamış, LPS: Lipopolisakkarit; emp: Empagliflozin, OSCC: Oral squamöz hücreli karsinom

TARTIŞMA

Bu çalışma, SCCL-MT1 ve UPSI-SCC131, OSCC hücre hatlarında NLRP3 enflammasom aktivasyonunda emp'nin rolünü araştırmaktadır. Bukkal mukozadan türetilen SCCL-MT1, güçlü immünomodülatör aktiviteye sahip invaziv ve rekürren bir OSCC modelidir.²³ Önceki çalışmalar, SCCL-MT1'in IL-1 β salgılanması yoluyla miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreleri uyarak tümör mikroçevresinde immünosupresyonu teşvik ettiğini ve bunun da efektör T-hücrelerinin baskılanmasına ve düzenleyici T-hücrelerinin artışına yol açtığını göstermiştir^{23,24}. Benzer şekilde, tütün ve alkol kullanım öyküsü olan bir hastadan elde edilen UPSI-SCC131, radyoterapiye dirençlidir^{25,26}. Bu direnç, IL-1 β salgılanmasının artmasıyla ilişkilendirilmiştir²⁷. İnvazivlik, immünomodülatör aktivite ve tedavi direnci gibi klinik olarak önemli özellikleri nedeniyle, bu çalışmada SCCL-MT1 ve UPSI-SCC131 hücre hatları kullanılarak emp'nin OSCC üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Empagliflozin Aracılı SLC2A3 ve NLRP3 Arasındaki Mekanik Bağlantı

IL-1 β 'nin *in vitro* üretimi ve salgılanması, NLRP3 enflammasomunun iki aşamalı aktivasyonunu gerektirir. Hazırlık aşamasında, LPS gibi patojenle ilişkili uyarıcılar Toll-like reseptörleri aktive eder, bu da NF- κ B sinyal iletimine ve NLRP3 transkripsiyonunun artmasına yol açar. Aktivasyon aşamasında, ATP P2X7 reseptörünü uyarak potasyum çıkışı indükler ve NLRP3 enflammasomunun birleşmesini teşvik eder. Bu süreç, pro-kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β salgılanmasıyla sonuçlanır²⁸⁻³⁰. Bu nedenle, SCCL-MT1 ve UPSI-SCC131 hücrelerini LPS ile uyarak ve ardından ATP'ye maruz bırakarak IL-1 β salgılanmasını analiz ederek emp'nin NLRP3 aktivasyonu üzerindeki etkisini değerlendirdik.

Bu mekanik bilgilerden yola çıkarak, bulgularımız, glikoz taşınımının farmakolojik inhibitörü olan Emp³¹ ile tedavinin, SLC2A3 (GLUT3) mRNA ekspresyonunu aşağı regüle ettiğini ve bu da OSCC hücrelerinde glikoz alımının azaldığını gösterdi³¹. Emp ayrıca NLRP3 ekspresyonunu baskılar ve enflammasom aktivasyonunu inhibe ederek IL-1 β salgılanmasının azalmasına yol açar. Bu bulgular, kanser hücrelerinde glikoz metabolizması ve enflamasyonun düzenlenmesinde SLC2A3 ve NLRP3 arasında fonksiyonel bir bağlantı olduğunu düşündürmektedir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışma, SLC2A3 ekspresyonunun artması ile epitelyal-mezenkimal geçiş ve NF- κ B sinyal yollarının aktivasyonu arasında bir ilişki olduğunu ve bunun baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarında kötü prognoza katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur³². NF- κ B, priming fazında NLRP3 ve pro-IL-1 β transkripsiyonunu yukarı regüle ederek enflammasom aktivasyonunun başlatılmasında önemli bir rol oynar³³. Çalışmamızda, patojenle ilişkili moleküler

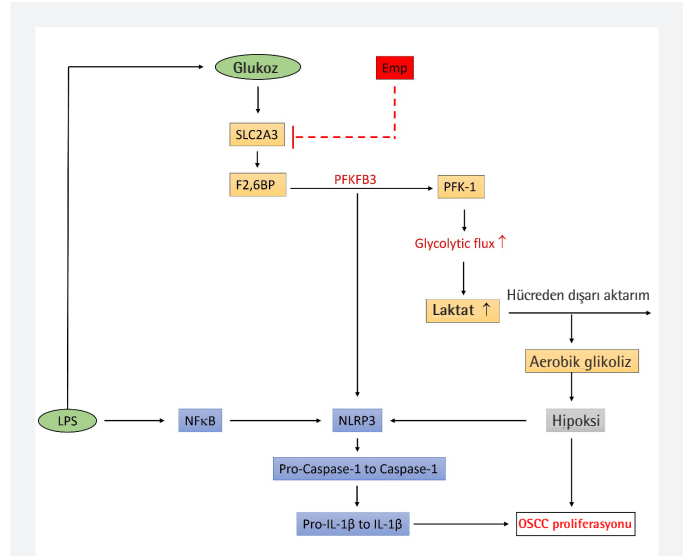
paternleri modellemek için LPS kullanıldı. Önemli olarak, LPS stimülasyonu olmasa bile, Emp, IL-1 β sekresyonu ile birlikte SLC2A3 ve NLRP3 ekspresyonunu baskıladı. Bu bulgular, SLC2A3 aracılı glikoz alımının tek başına enflammasom aktivasyonuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Nitekim, önceki çalışmalar, glikoz taşınmasının artmasının, NLRP3 aktivasyonunun en belirgin olduğu hücre tipi olan makrofajlarda³⁴ enflamatuvar sinyalleşmeyi tetiklediğini göstermiştir³⁵.

Bu bağlantıyı daha fazla araştırmak için, bir gen-gen etkileşimi analizi yaptık ve bu analiz, glikolizi düzenleyen enzim 6-fosfofrukto-2-kinaz/frukto-2, 6-bisfosfataz 3 (PFKFB3) aracılığıyla SLC2A3 ve NLRP3 arasında potansiyel bir mekanik bağlantı olduğunu gösterdi. Kanser hücreleri, glikoz alımını artırmak için SLC2A3 gibi GLUT aşırı eksprese eder, bu da hücre içi fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP) seviyelerini yükseltir. Bu metabolit, glikolizde hız sınırlayıcı enzim olan fosfofruktokinaz-1'i allosterik olarak aktive eder. PFKFB3, F2,6BP sentezini teşvik ederek, glikolitik akışı hızlandırarak ve laktat üretimini artırarak bu etkiyi güçlendirir. Laktat, mitokondriyal oksidatif metabolizmayı atlayarak hücreden dışarı atılır ve aerobik glikolize bağımlılığı artırır. Bu değişim, hızlı çoğalmayı destekler ve hipoksik tümör mikroçevresini besler³⁶. Ortaya çıkan kanıtlar, PFKFB3'ün sadece glikolitik akışı teşvik etmekle kalmayıp, aynı zamanda NLRP3 enflammasom aktivasyonuna da katkıda bulunduğunu göstermektedir. PFKFB3'ün baskılanmasının glikolizi azalttığı³⁶ ve makrofajlarda NLRP3'ün PFKFB3 aracılığıyla glikolizi düzenleyebildiği³⁷ gösterilmiştir. Ayrıca, PFKFB3'ün indüklediği hipoksinin NLRP3 aktivasyonunu tetiklediği, PFKFB3'ün aşağı regülasyonunun ise ateroskleroz modelinde kaspaz-1 ve IL-1 β dahil olmak üzere NLRP3'ün aşağı akış hedeflerini azalttığı bildirilmiştir³⁸. Özellikle, LPS'nin yüksek glikozla ilişkili hipoksinin indüklediği ROS üretimini artırarak NLRP3 aktivasyonunu şiddetlendirdiği gösterilmiştir³⁹.

Bu bulgular, SLC2A3-PFKFB3-NLRP3 ekseninin OSCC'de glikoz metabolizmasındaki değişiklikler ile enflamasyon arasında potansiyel bir mekanik bağlantı olabileceği hipotezini desteklemektedir (Şekil 4). Her ne kadar bilgisayar simülasyonlarına dayalı olsa da, bu yolak, SLC2A3'ü baskılayarak emp'nin, muhtemelen PFKFB3'ü modüle ederek NLRP3 enflammasom aktivasyonunu zayıflatabileceğini ve böylece ağız kanserinde hem metabolik hem de ant-enflamatuvar etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

OSCC Üzerinde Emp'nin Terapötik Etkileri

NLRP3 enflammasomunun kanserdeki rolü tartışmalıdır. Bazı çalışmalar NLRP3'ün aşırı ekspresyonunu tümörün agresifliği ve kötü prognozla ilişkilendirirken, diğerleri inhibisyonunun minimal etkileri olduğunu bildirmiştir⁴⁰. Glibenklamid ve



Şekil 4. OSCC'de Varsayımsal SLC2A3-PFKFB3-NLRP3 eksenini ve emp'nin etkisini şematik gösterimi. Emp, SLC2A3'ü aşağı regüle ederek glikoz alımını baskılar, bu da PFKFB3 aktivitesinin azalmasına ve ardından NLRP3 enflammasom aktivasyonunun azalmasına yol açabilir. Önerilen bu yol, OSCC'de glikoz metabolizmasındaki değişiklikleri enflamasyonla ilişkilendirir

LPS: Lipopolisakkarit; emp: Empagliflozin, OSCC: Oral squamöz hücreli karsinom, SLC2A3: Taşıyıcı çözücü taşıyıcı ailesi 2 üyesi 3

VX765, iki NLRP3 inhibitörü kullanarak yaptığımız önceki çalışmamızda, OSCC hücre proliferasyonunda sadece mütevazı bir azalma görülmüştür^{22,41}. Buna karşın, emp daha belirgin bir anti-kanser etkisi sergilemiş, OSCC hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltmış ve yara iyileşmesini bozmuştur, bu da çift metabolik ve enflamatuvar modülasyon yoluyla daha büyük bir terapötik potansiyel olduğunu düşündürmektedir.

Özellikle, SLC2A3'ün TGF- β sinyal yoluyla OSCC ilerlemesini teşvik ettiği bilinmektedir⁴². Ayrıca, TGF- β sinyal yolunun IL-1 β kaynaklı otokrin mekanizma yoluyla kronik enflamasyonda rol oynadığı düşünülmektedir⁴³. Bu çalışmada test edilmemiş olsa da, emp'nin TGF- β sinyal iletimini inhibe ettiği bildirilmiştir⁴⁴ ve bu, OSCC üzerindeki etkilerinin potansiyel bir ek mekanizmasını düşündürmektedir ve daha fazla araştırma gerektirmektedir. SLC2A3 aracılı glikoz taşınımı ve TGF- β -IL-1 β sinyal iletim yollarının yakınsaması, OSCC'de yeni bir terapötik hedef eksenini temsil edebilir.

Toplamda, bu veriler glikoz taşınmasının OSCC'nin agresifliğine katkıda bulunduğu ve emp tarafından inhibisyonunun bu fenotipi baskılayabileceği hipotezini desteklemektedir. LPS ile indüklenen enflamatuvar koşullar altında, proliferasyon ve göç oranları artmış, ancak emp tarafından etkili bir şekilde

azaltılmıştır. Bu bulgular, emp'nin sadece bir antidiyabetik ajan olarak değil, aynı zamanda OSCC'de metabolik-enflamatuvar etkileşimi hedefleyen yeniden amaçlanmış bir terapötik aday olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Emp ve Geleneksel NLRP3 İnhibitörlerinin Karşılaştırılması

Mekanik olarak, Glibenklamid, NLRP3 monomerinin birleşmesini engelleyerek enflammasom oluşumunu önlerken, VX765, IL-1 β olgunlaşması için gerekli olan kaspaz-1 aktivasyonunu inhibe eder^{22,41,45}. Emp, enflammasom kompleksini doğrudan hedef almamasına rağmen, bulgular, glikozun kullanılabilirliğini sınırlandırarak önemli bir yukarı akış uyarıcısı olan NLRP3 ekspresyonunu azalttığını göstermektedir. Bu nedenle, Emp, NLRP3 yolunda daha erken etki gösterebilir ve SLC2A3 ile ilişkili sinyal iletimi yoluyla ek etkiler gösterebilir.

Genel olarak, bu çalışma, glikoz alımının metabolik düzenlemesinin OSCC hücreleri ile ilişkili enflamasyonun ilerlemesinde kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Özellikle, SLC2A3 ve NLRP3 arasındaki dolaylı etkileşim, bu enflamatuvar yanıtın şekillenmesine katkıda bulunabilir. Bu bağlamda, emp gibi glikoz taşıma inhibitörleri ile tedaviden sonra gözlenen proliferasyon ve göçün baskılanması, muhtemelen NLRP3 ekspresyonunun aşağı regülasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu azalma, enflamasyona karışan NLRP3 ile ilişkili sinyal yollarını sınırlandırarak, tümör oluşumunu destekleyen sitokinlerin salgılanmasını azaltabilir.

Nitekim, hem bazal hem de LPS ile indüklenen enflamatuvar koşullar altında emp'nin etkileri, glikoz alımının inhibisyonunun, kanser hücrelerinde proenflamatuvar sinyalleşmeyi azaltma ve otokrin sitokin döngülerini bozma potansiyelini vurgulamaktadır.

Çalışma Kısıtlılıkları

Bu çalışma, iki ticari hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen bir *in vitro* araştırmadır. OSCC enflamasyonunda, tümör mikroçevresindeki kanserli olmayan hücrelerin enflamatuvar aktiviteleri ve kanser hücreleriyle etkileşimleri rol oynar. Ancak, bu çalışmadaki deney düzeneği, yalnızca kanser hücrelerini içeren homojen bir sistemden oluşmaktadır, bu da tümör mikroçevresinin etkisini dışlamaktadır. Bu, çalışmamızın bir sınırlılığıdır.

Ayrıca, çalışmada ön sitotoksiste ve etkinlik verilerine göre seçilen tek bir emp konsantrasyonu kullanılmıştır. Etkili olmasına rağmen, tek bir dozun kullanılması, doz-yanıt yorumunu kısıtlar ve olası konsantrasyona bağlı etkileri veya terapötik pencereleri hesaba katmaz. Birden fazla konsantrasyon ve zaman noktası kullanılarak yapılan ek deneyler, OSCC'de emp'nin farmakodinamik anlayışını geliştirecektir.

Bir diğer önemli sınırlama, *in vivo* doğrulamanın olmamasıdır. Hayvan modeli verileri olmadan, emp'nin sistemik etkilerini, farmakokinetiğini veya canlı bir organizma içindeki potansiyel etkileşimlerini tahmin etmek zordur.

Ayrıca, bu çalışma hasta temelli bir çalışma olmadığı için, odak noktası yalnızca emp'nin kanser hücresi biyolojisi üzerindeki etkileridir ve hasta heterojenliği, etiyolojik farklılıklar ve epigenetik çeşitlilikten kaynaklanan potansiyel varyasyonlar dikkate alınmamıştır. Bu faktörler, bulgularımızın klinik genelleştirilebilirliğini ve translasyonel uygulanabilirliğini sınırlayabilir.

SONUÇ

Sonuç olarak, bulgularımız SGLT2 inhibitörü olan emp'nin SLC2A3 ve NLRP3 ekspresyonunu baskılayarak OSCC hücre proliferasyonunu ve göçünü azalttığını göstermektedir. Glukoz metabolizmasını bozarak ve NLRP3 inhibisyonu yoluyla kronik enflamasyonu hafifleterek ikili etkisi, OSCC'nin agresif fenotipini zayıflatabilir. Bu bulgular, emp'nin OSCC için bir terapötik ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır, ancak klinik etkinliğini doğrulamak için daha fazla çalışma gereklidir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma insan veya hayvan denekleri içermediğinden etik onay gerekmemektedir. İlgili ifade makaleye de eklenmiştir. Bu çalışma, ticari olarak temin edilebilen iki hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmadır.

Hasta onamı: Hastalardan veya deney hayvanlarından elde edilmiş herhangi bir biyolojik materyal kullanılmamış, ayrıca hiçbir hastaya ait klinik veya kişisel veri çalışmaya dahil edilmemiştir.

Dipnot

Yazarlık Katkıları

Finansal Destek: Bu çalışma için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Chen Y, Han Z, Zhang L, Gao C, Wei J, Yang X, et al. TIMELESS promotes reprogramming of glucose metabolism in oral squamous cell carcinoma. *J Transl Med.* 2024;22:21.
2. Oizel K, Chauvin C, Oliver L, Gratas C, Geraldo F, Jarry U, et al. Efficient mitochondrial glutamine targeting prevails over glioblastoma metabolic plasticity. *Clin Cancer Res.* 2017;23:6292-6304.
3. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol.* 2011;2:49.

4. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? [published correction appears in Trends Biochem Sci. 2016;41:287]. Trends Biochem Sci. 2016;41:211-218.
5. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes [published correction appears in Science. 2012;11;336:670]. Science. 2010;330:1340-1344.
6. Ortega MA, De Leon-Oliva D, García-Montero C, Fraile-Martínez O, Boaru DL, de Castro AV, et al. Reframing the link between metabolism and NLRP3 inflammasome: therapeutic opportunities. Front Immunol. 2023;14:1232629.
7. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Med. 2015;21:677-687.
8. Gupta S, Roy A, Dwarakanath BS. Metabolic cooperation and competition in the tumor microenvironment: implications for therapy. Front Oncol. 2017;7:68.
9. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003;3:721-732.
10. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. Cell. 2017;168:657-669.
11. Martínez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14:113.
12. Yager JY. Glucose and perinatal brain injury-questions and controversies. Elsevier. 2019:141-161.
13. Ayala FR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, da Cunha IW, Lourenço SV, et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. Molecules. 2010;15:2374-2387.
14. Kumari A, Jha A, Tiwari A, Nath N, Kumar A, Nagini S, et al. Role and regulation of GLUT1/3 during oral cancer progression and therapy resistance. Arch Oral Biol. 2023;150:105688.
15. Wang H, Luo Q, Feng X, Zhang R, Li J, Chen F. NLRP3 promotes tumor growth and metastasis in human oral squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2018;18:500.
16. Dąbrowski M. Diabetes, antidiabetic medications and cancer risk in type 2 diabetes: focus on SGLT-2 Inhibitors. Int J Mol Sci. 2021;22:1680.
17. Dutka M, Bobiński R, Francuz T, Garczorz W, Zimmer K, Ilczak T, et al. SGLT-2 inhibitors in cancer treatment-mechanisms of action and emerging new perspectives. Cancers (Basel). 2022;14:5811.
18. Wu W, Wang Y, Xie J, Fan S. Empagliflozin: a potential anticancer drug. Discov Oncol. 2023;14:127.
19. Kocaeli AA, Tekin C, Ercelik M, Tezcan G, Aksoy SA, Kocaeli H, et al. Concurrent presence of diabetes affects the GLUT3 programming of glucose metabolism in glioblastoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2023;27:8110-8118.
20. Benetti E, Mastrocola R, Vitarelli G, Cutrin JC, Nigro D, Chiazza F, et al. Empagliflozin protects against diet-induced NLRP-3 inflammasome activation and lipid accumulation. J Pharmacol Exp Ther. 2016;359:45-53.
21. Tezcan G, Alsaadi M, Hamza S, Garanina EE, Martynova EV, Ziganshina GR, et al. Azithromycin and ceftriaxone differentially activate NLRP3 in LPS primed cancer cells. Int J Mol Sci. 2022;23:9484.
22. Hamza S, Garanina EE, Shkair L, Alsaadi M, Khaiboullina SF, Tezcan G. Implications of NLRP3 suppression using glibenclamide and miR-223 against colorectal cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2024;17:299.
23. Russell SM, Lechner MG, Gong L, Megiel C, Liebertz DJ, Masood R, et al. USC-HN2, a new model cell line for recurrent oral cavity squamous cell carcinoma with immunosuppressive characteristics. Oral Oncol. 2011;47:810-817.
24. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells [published correction appears in J Immunol. 2010 Nov 1;185:5668]. J Immunol. 2010;185:2273-2284.
25. White JS, Weissfeld JL, Ragin CC, Rossie KM, Martin CL, Shuster M, et al. The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Oral Oncol. 2007;43:701-712.
26. Sürer Şİ, Elçitepe TB, Akçay D, Daşkın E, Çalibaşı Kocal G, Arıcan Alıcıkuş Z, et al. A promising, novel radiosensitizer nanodrug complex for oral cavity cancer: cetuximab and cisplatin-conjugated gold nanoparticles. Balkan Med J. 2021;38:278-286.
27. Tiwari DK, Hannen R, Unger K, Kohl S, Heß J, Lauber K, et al. IL1 pathway in HPV-Negative HNSCC cells is an indicator of radioresistance after photon and carbon ion irradiation without functional involvement. Front Oncol. 2022;12:878675.
28. Tengesdal IW, Dinarello CA, Marchetti C. NLRP3 and cancer: pathogenesis and therapeutic opportunities. Pharmacol Ther. 2023;251:108545.
29. Gurung P, Li B, Subbarao Malireddi RK, Lamkanfi M, Geiger TL, Kanneganti TD. Chronic TLR stimulation controls NLRP3 inflammasome activation through IL-10 mediated regulation of NLRP3 expression and caspase-8 activation. Sci Rep. 2015;5:14488.
30. Rotondo JC, Mazziotta C, Lanzillotti C, Stefani C, Badiale G, Campione G, et al. The role of purinergic P2X7 receptor in inflammation and cancer: novel molecular insights and clinical applications. Cancers (Basel). 2022;14:1116.
31. Zügner E, Yang HC, Kotzbeck P, Boulgaropoulos B, Sourij H, Hagvall S, et al. Differential in vitro effects of SGLT2 inhibitors on mitochondrial oxidative phosphorylation, glucose uptake and cell metabolism. Int J Mol Sci. 2022;23:7966.
32. Chai F, Zhang J, Fu T, Jiang P, Huang Y, Wang L, et al. Identification of SLC2A3 as a prognostic indicator correlated with the NF-κB/EMT axis and immune response in head and neck squamous cell carcinoma. Channels. 2023;17:2208928.
33. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017;2:17023.
34. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. Immunol Rev. 2012;249:218-238.
35. Lebreton F, Berishvili E, Parnaud G, Rouget C, Bosco D, Berney T, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets. Cell Death Dis. 2018;25:9:726.
36. Lu L, Chen Y, Zhu Y. The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer. Oncotarget. 2017;24:62793-62802.
37. Finucane OM, Sugrue J, Rubio-Araiz A, Guillot-Sestier MV, Lynch MA. The NLRP3 inflammasome modulates glycolysis by increasing PFKFB3 in an IL-1β-dependent manner in macrophages. Sci Rep. 2019;9:4034.
38. Wang X, Liu X, Wu W, Liao L, Zhou M, Wang X, Tan Z, Zhang G, Bai Y, Li X, Zhao M. Hypoxia activates macrophage-NLRP3 inflammasome promoting atherosclerosis via PFKFB3-driven glycolysis. FASEB J. 2024 Aug 15;38:e23854.
39. Qiu Z, He Y, Ming H, Lei S, Leng Y, Xia ZY. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9C2 cardiomyocytes. J Diabetes Res. 2019;17:8151836.

40. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17:158.
41. Tezcan G, Garanina EE, Alsaadi M, Gilazieva ZE, Martinova EV, Markelova MI, et al. Therapeutic potential of pharmacological targeting NLRP3 inflammasome complex in cancer. *Front Immunol*. 2021;11:607881.
42. Jiang W, Xu S, Li P. SLC2A3 promotes tumor progression through lactic acid-promoted TGF- β signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2024;19:e0301724.
43. Kang H, Seo E, Oh YS, Jun HS. TGF- β activates NLRP3 inflammasome by an autocrine production of TGF- β in LX-2 human hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem*. 2022;477:1329-1338.
44. Shentu Y, Li Y, Xie S, Jiang H, Sun S, Lin R, et al. Empagliflozin, a sodium glucose cotransporter-2 inhibitor, ameliorates peritoneal fibrosis via suppressing TGF- β /Smad signaling. *Int Immunopharmacol*. 2021;93:107374.
45. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 inflammasome. *Front Immunol*. 2019;10:2538.