

论著·实验研究

小胶质细胞焦亡在缺氧缺血性脑损伤中的作用

谭兰兰^{1,2} 李梅² 冯晨希² 徐利晓² 丁欣^{1,3} 孙斌^{1,3} 李根² 冯星^{1,2,3}

(1. 苏州大学附属儿童医院新生儿科, 江苏 苏州 215025;
2. 苏州大学附属儿童医院儿科临床研究院, 江苏 苏州 215025;
3. 苏州市小儿内科临床医学中心, 江苏 苏州 215025)

[摘要] **目的** 初步探讨小胶质细胞焦亡在缺氧缺血性脑损伤中的作用。**方法** 建立体外培养大鼠小胶质细胞系氧糖剥夺再灌注(OGD/R)模型,用Western blot法检测OGD/R后0、1、3、6、12及24 h焦亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、Gasdermin D蛋白N端(GSDMD-N)的表达情况。用慢病毒构建的沉默Gasdermin D(GSDMD)序列转染小胶质细胞,使用免疫荧光和Western blot法检测GSDMD转染效率。将小胶质细胞系分为正常对照组、阴性对照组、LV-sh_GSDMD组(慢病毒沉默GSDMD),使用CCK-8和LDH试剂盒检测沉默GSDMD对OGD/R后24 h小胶质细胞活性和毒性的影响;通过Western blot法检测沉默GSDMD对OGD/R后24 h小胶质细胞中caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 含量变化的影响。**结果** 在OGD/R后0 h起小胶质细胞内焦亡相关蛋白caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达水平即较OGD/R前发生了上调,并且在24 h达到高峰($P<0.05$)。成功地构建慢病毒沉默GSDMD转染小胶质细胞模型。OGD/R后24 h,与正常对照组相比,沉默GSDMD可提高细胞活性和降低细胞毒性($P<0.05$),降低小胶质细胞内caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 蛋白水平($P<0.05$)。**结论** 慢病毒沉默细胞焦亡关键底物蛋白GSDMD可减轻缺氧缺血性脑损伤,提示小胶质细胞焦亡加重缺氧缺血性脑损伤。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(11): 1226-1232]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;细胞焦亡;氧糖剥夺再灌注;大鼠小胶质细胞

Role of microglial pyroptosis in hypoxic-ischemic brain damage

TAN Lan-Lan, LI Mei, FENG Chen-Xi, XU Li-Xiao, DING Xin, SUN Bin, LI Gen, FENG Xing. Department of Neonatology, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215025, China (Feng X, Email: xing_feng66@suda.edu.cn)

Abstract: Objective To investigate the role of microglial pyroptosis in hypoxic-ischemic brain damage. **Methods** An oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model of rat microglial cells were cultured *in vitro*. Western blot was used to measure the expression of the pyroptosis-related proteins caspase-1, interleukin-1 β (IL-1 β), and N-terminal gasdermin D (GSDMD-N) at 0, 1, 3, 6, 12, and 24 hours after OGD/R. After the microglial cells were transfected with lentivirus-mediated silenced gasdermin D (GSDMD), immunofluorescence assay and Western blot were used to measure the transfection rate of GSDMD. Microglial cell lines were divided into three groups: normal control, negative control, and LV-sh_GSDMD (lentivirus-mediated GSDMD silencing). CCK-8 assay and LDH kit were used to observe the effect of GSDMD silencing on the viability and toxicity of microglial cells at 24 hours after OGD/R. Western blot was used to observe the effect of GSDMD silencing on the levels of caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β in the microglial cells at 24 hours after OGD/R. **Results** The expression levels of the pyroptosis-related proteins caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β in microglial cells were upregulated since 0 hour after OGD/R and reached the peak levels at 24 hours. A microglial cell model of lentivirus-mediated GSDMD silencing was successfully constructed. At 24 hours after OGD/R, compared with the normal control group, the GSDMD silencing group had a significant increase in the cell viability and a significant

[收稿日期] 2020-05-18; [接受日期] 2020-09-30

[基金项目] 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19_1998);国家自然科学基金(81771625);苏州市小儿内科临床医学中心项目(Szzx201504)。

[作者简介] 谭兰兰,女,硕士研究生。

[通信作者] 冯星,男,主任医师,教授。Email: xing_feng66@suda.edu.cn。

reduction in the cytotoxicity ($P<0.05$), as well as significant reductions in the protein expression levels of caspase-1, GSDMD-N, and IL-1 β in microglial cells ($P<0.05$). **Conclusions** Lentivirus silencing of the key substrate protein for pyroptosis GSDMD can alleviate hypoxic-ischemic brain damage, suggesting that microglial pyroptosis aggravates hypoxic-ischemic brain damage. [Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(11): 1226-1232]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Pyroptosis; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; Rat microglial cell

缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 常导致新生儿死亡或严重的、不可逆的神经功能缺损^[1-2]。迄今为止, HIE 的治疗仍以支持疗法及亚低温疗法等为主, 但其疗效有待提高。因此, 进一步明确 HIE 的发病机制, 有助于寻找 HIE 新的治疗方法。

缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 是 HIE 的病理过程, 常导致大量神经元死亡, 从而不可避免地引发炎症, 这种炎症主要由小胶质细胞介导, 小胶质细胞是中枢神经系统中唯一的固有免疫细胞^[3]。脑损伤后, 小胶质细胞是发生反应最早的细胞, 并且常导致不利后果, 如激活星形胶质细胞形成胶质疤痕^[4]。目前, 研究发现小胶质细胞介导的炎症反应在 HIBD、脑中风和创伤性脑损伤中扮演着重要角色^[5-8]。

焦亡 (pyroptosis) 是近年来新发现的一种与炎症反应相关的细胞程序性死亡方式^[9-10]。相较于其他细胞死亡类型具有明显的特殊性, 从形态学上讲, 焦亡兼具坏死和凋亡的双重特征, 同时伴随炎症反应。焦亡在早期表现出染色质浓缩、DNA 片段化及 TUNEL 染色阳性等凋亡的特征; 随后细胞的细胞膜上会形成众多 1~2 nm 大小的孔隙, 使细胞膜失去完整性, 呈坏死样表现; 最终细胞肿胀和膜破裂并释放大量的细胞内容物, 引发级联放大的瀑布式炎症反应^[11]。NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP-3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (caspase-1)/Gasdermin D (GSDMD) 轴构成经典焦亡通路。研究发现, GSDMD 是细胞焦亡的直接效应器, 在被上游因素激动后, Gasdermin D 蛋白 N 端 (GSDMD-N) 结构域从其 C 端结构域释放出来, 靶向结合脂质膜, 并且聚合成一个中空的环状低聚物, 形成非选择性孔道致细胞肿胀, 从而诱导细胞焦亡的发生, 引发局部乃至全身的炎症反应^[12]。最新研究发现, 小胶质细胞焦亡在 HIBD 的病理生理学中扮演着重要的角色^[13]。

因此, 本研究拟通过体外实验初步探讨小胶

质细胞焦亡在 HIBD 中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及分组

大鼠小胶质细胞系购于上海酶联生物科技有限公司细胞库。(1) 将培养好的大鼠小胶质细胞系根据处理方式的不同, 分为正常对照组和氧糖剥夺再灌注组 (OGD/R 组), OGD/R 组再分为 0、1、3、6、12、24 h 组。(2) 慢病毒转染大鼠小胶质细胞系, 分为正常对照组和慢病毒转染组, 慢病毒转染组再分为阴性对照组 (慢病毒空载)、LV-sh_GSDMD 1 组 (慢病毒沉默 GSDMD 序列 1)、LV-sh_GSDMD 2 组 (慢病毒沉默 GSDMD 序列 2)、LV-sh_GSDMD 3 组 (慢病毒沉默 GSDMD 序列 3)。(3) 将培养好的大鼠小胶质细胞系根据处理方式的不同, 分为正常培养组和 OGD/R 24 h 组, 两组分别再分为正常对照组、阴性对照组、LV-sh_GSDMD 组。

1.2 主要试剂

O₂ (浓度 <1%) + CO₂ (浓度 5%) + N₂ (浓度 95%) 混合气体 (苏州市金宏气体有限公司); DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基、不含葡萄糖的厄尔平衡盐缓冲溶液 (EBSS) (Gibco, 美国); 胎牛血清 (Biological Industries, 以色列); 青霉素-链霉素溶液 (上海碧云天生物技术有限公司); 兔抗 caspase-1、GSDMD、IL-1 β (Abcam, 英国); 鼠抗 β -actin 抗体 (杭州联科生物科技股份有限公司); 慢病毒空载、慢病毒沉默 GSDMD 序列 1、GSDMD 序列 2 及 GSDMD 序列 3 (上海吉凯基因化学技术有限公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁化学科技研究所); LDH 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.3 大鼠小胶质细胞系的培养

大鼠小胶质细胞系的培养基是 89% DMEM/HIGH GLUCOSE+10% 胎牛血清 +1% 青霉素-链霉素溶液, 于 37℃、饱和湿度 5%CO₂ 孵箱中培养。

1.4 构建大鼠小胶质细胞系 OGD/R 模型

细胞种板培养,待细胞丰度达到80%,吸出原有培养基,用 $1\times$ PBS清洗2次后,更换为EBSS后放入细胞缺氧舱(O_2 浓度 $<1\%$, CO_2 浓度 5% , N_2 浓度 95%)中2h后取出,立即换成原培养基(89% DMEM/HIGH GLUCOSE+10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素溶液)^[13]。将上述操作全部完成的时间点设定为0h,并且另外设定1、3、6、12及24h,共6个时间点,培养箱继续培养至相应时间点进行收样检测。正常对照组不进行OGD/R处理。实验独立重复3次。

1.5 Western blot 法检测蛋白表达

将每个样品在蛋白裂解缓冲液中进行溶解和匀浆,并提取总蛋白。将收集好的待检测的样品使用蛋白试剂盒调成相同浓度,然后按照比例向其中加入 $5\times$ 蛋白上样缓冲液并且在涡旋震荡器上混匀,置于沸水浴中($100^\circ C$)煮沸使蛋白充分变性10min。使用微量加样器将各组样品及marker按顺序进行上样。上样完成后连接电源进行电泳,先用60V电压,当蛋白进入至浓缩胶和分离胶的交界处时改为90V电压继续电泳,当marker移动至快接近分离胶底端时停止电泳。将分离胶取下来,转膜前自下而上按照黑板-三张滤纸-分离胶-PVDF膜-三张滤纸-白板的顺序进行叠放,PVDF膜预先用甲醇浸泡预处理1min以打开孔径,叠放完成后放入置有碎冰的转移槽缓冲液中,以230mA、60min恒流进行转膜,操作结束后取出PVDF膜。取出的膜置于5%脱脂牛奶中常温摇床封闭2h,封闭结束后,使用 $1\times$ TBST漂洗3次,每次10min,加入caspase-1(1:1000)、GSDMD(1:1000)、IL-1 β (1:1000)、GSDMD-N(1:1000)、 β -actin(1:10000)一抗,摇床上常温摇1h后置于 $4^\circ C$ 摇床过夜。次日弃去一抗溶液,使用 $1\times$ TBST漂洗3次,每次10min;之后分别加入鼠二抗 β -actin(1:5000),其余均为兔二抗(1:5000),并且置于摇床上摇1h;弃去二抗溶液,使用 $1\times$ TBST洗膜3次,每次10min。使用ECL显影液试剂盒和蛋白显影仪进行显影,所获得的图像的灰度值分析采用Image J软件进行。

1.6 慢病毒转染大鼠小胶质细胞系

将细胞接种于24孔板中,待细胞丰度至80%时进行慢病毒转染实验。将冻存于 $-80^\circ C$ 冰箱中的

慢病毒取出后置于冰上融化,使用离心机稍微离心使病毒液完全沉于离心管底部。根据预实验中已确认的感染复数(MOI)值($MOI=100$)及病毒滴度($9\times 10^8/mL$)计算慢病毒使用量并且将其稀释到无血清培养基中[慢病毒的使用量=($MOI\times$ 细胞数目)/病毒滴度],吸取病毒液(慢病毒沉默GSDMD序列1、GSDMD序列2、GSDMD序列3或慢病毒空载)并将其分别加入各组细胞中,将细胞放入 $37^\circ C$ CO_2 培养箱中培养,感染约12h,更换新鲜的培养基。72h后利用免疫荧光和Western blot以判断转染效率,带绿色荧光的是转染上的目的细胞,转染效率在90%以上,提示可用于后续实验。实验独立重复3次。

1.7 CCK-8 法检测细胞活力

将大鼠小胶质细胞系以 1×10^4 细胞/孔的密度接种在96孔板上,并且每孔的培养基为100 μL 。经过OGD/R后24h,吸出培养基,将每个孔中的培养基换成100 μL 培养基+10 μL CCK-8,并且于 $37^\circ C$ CO_2 培养箱中孵育2h,2h后取出,使用96孔板酶标仪在450nm处测量样品的吸光度(OD)。实验独立重复3次。

1.8 LDH 试剂盒法检测细胞 LDH 漏出率

将大鼠小胶质细胞系以 1×10^4 细胞/孔的密度接种在96孔板上,并且每孔的培养基为100 μL 。经过OGD/R后24h,从每孔中收集50 μL 上清液,并且按照LDH试剂盒操作步骤进行加样操作,混匀后室温放置5min,使用酶标仪在450nm处测定各样品OD值,计算LDH漏出率。实验独立重复3次。

1.9 统计学分析

采用GraphPad Prism 5统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,OGD/R前后比较采用配对 t 检验;多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 处理后的大鼠小胶质细胞系内焦亡相关蛋白 caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 水平的时程变化

Western blot 结果显示,OGD/R处理后

0 h起小胶质细胞内焦亡相关蛋白 caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达水平即发生了上调,并且在24 h这个时间点达到高峰(表1,图1)。结果提示,OGD/R后小胶质细胞内激活了焦亡相关蛋白表达。

2.2 慢病毒沉默 GSDMD 转染大鼠小胶质细胞系

用慢病毒构建带有绿色荧光的沉默 GSDMD 序列(LV-sh_GSDMD-GFP)转染小胶质细胞,72 h后利用荧光显微镜观察。免疫荧光结果显示, LV-sh_GSDMD 1组、LV-sh_GSDMD 2组和 LV-sh_GSDMD 3组均有效地转染小胶质细胞(图2)。为进一步验证 LV-sh_GSDMD 的干扰效率,采用 Western blot 检测结果显示,正常对照组、阴性对照组、LV-sh_GSDMD 1组、LV-sh_GSDMD 2组和 LV-sh_GSDMD 3组的 GSDMD 蛋白表达量分别为 0.852 ± 0.013 、 0.846 ± 0.009 、 0.137 ± 0.002 、 0.828 ± 0.013 、 0.844 ± 0.015 ,各组比较差异有统计学意义($F=2302$, $P<0.0001$)。与正常对照组相比, LV-sh_GSDMD 1组降低了 GSDMD 蛋白表达量($P<0.001$)(图3)。提示 LV-sh_GSDMD 1组转染小胶质细胞成功,且对 GSDMD 蛋白表达的干扰效率最高,可用于后续实验。

表1 OGD/R后小胶质细胞中 caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 的表达变化 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	caspase-1	GSDMD-N	IL-1 β
正常对照组	0.261 ± 0.009	0.503 ± 0.004	0.797 ± 0.059
OGD/R 组			
0 h	0.394 ± 0.034^a	0.616 ± 0.033^a	1.072 ± 0.026^a
1 h	0.476 ± 0.056^a	0.601 ± 0.001^a	0.644 ± 0.037^a
3 h	0.344 ± 0.016	0.226 ± 0.003^a	0.918 ± 0.072
6 h	0.434 ± 0.036^a	0.251 ± 0.004^a	0.648 ± 0.062^a
12 h	0.336 ± 0.037	0.421 ± 0.006	0.728 ± 0.016
24 h	0.756 ± 0.062^a	0.755 ± 0.023^a	1.366 ± 0.019^a
F 值	49.48	466.50	94.98
P 值	<0.0001	<0.0001	<0.0001

注: [caspase-1] 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; [GSDMD-N] Gasdermin D 蛋白 N 端; [IL-1 β] 白细胞介素-1 β 。a 示与正常对照组比较, $P<0.05$ 。

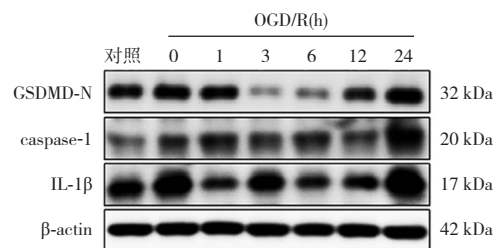


图1 Western blot 法检测各时间点小胶质细胞中 caspase-1、GSDMD-N 和 IL-1 β 表达电泳图

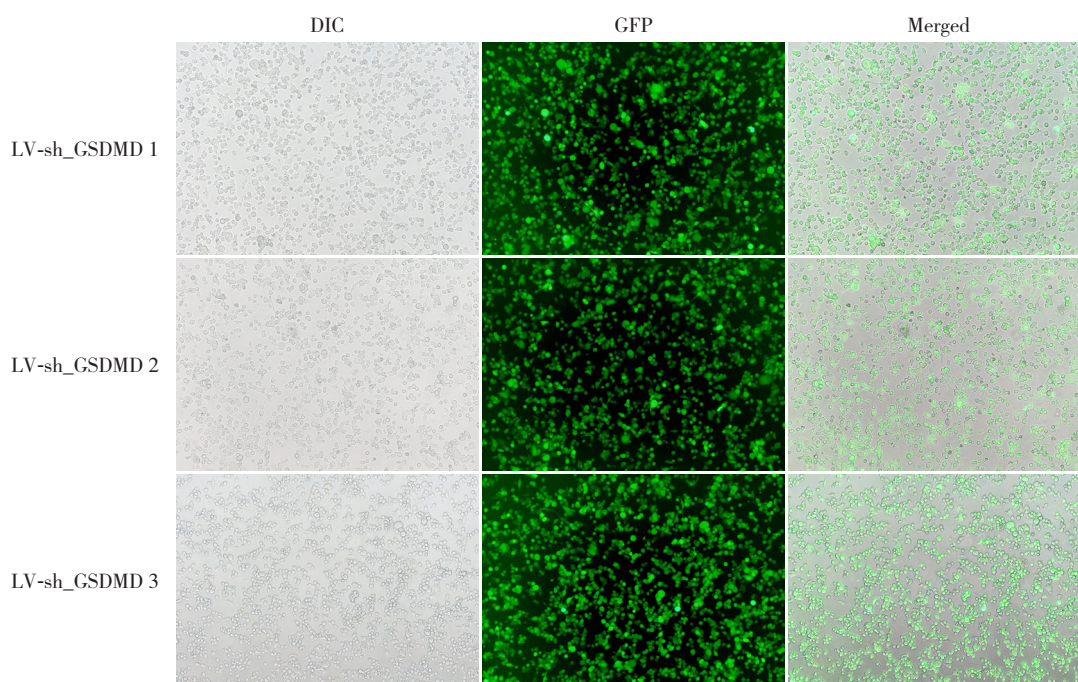


图2 慢病毒沉默 GSDMD 转染小胶质细胞荧光图($\times 100$) 慢病毒构建带有绿色荧光的沉默 GSDMD 序列1 (LV-sh_GSDMD 1)、序列2 (LV-sh_GSDMD 2)、序列3 (LV-sh_GSDMD 3) 均成功转染进入小胶质细胞内。

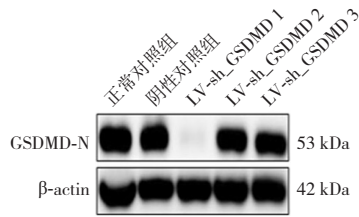


图 3 Western blot 法检测各组细胞中 GSDMD 表达电泳图 结果提示 GSDMD 序列 1 (LV-sh_GSDMD 1) 对 GSDMD 蛋白表达的干扰效率最高。

2.3 LV-sh_GSDMD 对 OGD/R 后的大鼠小胶质细胞活性的影响

实验结果显示,在正常培养条件下,正常对照组、阴性对照组、LV-sh_GSDMD 组小胶质细胞活性比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。OGD/R 24 h 时,与正常对照组相比, LV-sh_GSDMD 组细胞活性升高 ($P<0.05$),阴性对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。OGD/R 处理小胶质细胞后 24 h,正常对照组和阴性对照组小胶质细胞活性均较正常培养时降低 ($P<0.05$)。结果提示, LV-sh_GSDMD 可提高 OGD/R 后小胶质细胞活性。见表 2。

表 2 各组细胞活性比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	正常培养	OGD/R 24 h	t 值	P 值
正常对照组	1.42 ± 0.04	0.69 ± 0.03	24.420	<0.001
阴性对照组	1.43 ± 0.06	0.72 ± 0.11	9.663	<0.001
LV-sh_GSDMD 组	1.32 ± 0.20	1.11 ± 0.15^a	1.371	0.242
F 值	0.712	14.030		
P 值	0.528	0.006		

注: a 示与正常对照组比较, $P<0.05$ 。

2.4 LV-sh_GSDMD 对 OGD/R 后的大鼠小胶质细胞毒性的影响

通过检测小胶质细胞 LDH 漏出率反映细胞毒性,细胞 LDH 漏出率越高,细胞毒性越强。实验结果显示,在正常培养条件下,正常对照组、阴

性对照组和 LV-sh_GSDMD 组的细胞毒性比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。OGD/R 24 h 时,与正常对照组相比, LV-sh_GSDMD 组细胞毒性降低 ($P<0.05$),阴性对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。OGD/R 处理小胶质细胞后 24 h,正常对照组和阴性对照组细胞毒性均较正常培养时升高 ($P<0.05$)。结果提示, LV-sh_GSDMD 可降低 OGD/R 后小胶质细胞毒性。见表 3。

表 3 各组 LDH 漏出率情况比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	正常培养	OGD/R 24 h	t 值	P 值
正常对照组	0.34 ± 0.12	1.28 ± 0.13	9.091	<0.001
阴性对照组	0.42 ± 0.08	1.21 ± 0.06	13.710	<0.001
LV-sh_GSDMD 组	0.56 ± 0.04	0.72 ± 0.15^a	1.776	0.150
F 值	4.698	19.070		
P 值	0.059	0.002		

注: a 示与正常对照组比较, $P<0.05$ 。

2.5 LV-sh_GSDMD 对 OGD/R 后 24 h 的大鼠小胶质细胞系内焦亡相关蛋白 GSDMD-N、caspase-1、IL-1 β 水平的影响

Western blot 结果显示,在正常培养条件下,正常对照组、阴性对照组和 LV-sh_GSDMD 组小胶质细胞内 caspase-1、IL-1 β 蛋白水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), LV-sh_GSDMD 组 GSDMD-N 蛋白水平低于正常对照组 ($P<0.05$)。OGD/R 24 h 时,与正常对照组相比, LV-sh_GSDMD 组小胶质细胞内 caspase-1、IL-1 β 、GSDMD-N 蛋白水平降低 ($P<0.05$),阴性对照组上述指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。OGD/R 处理小胶质细胞后 24 h,正常对照组和阴性对照组小胶质细胞内 caspase-1、IL-1 β 、GSDMD-N 蛋白水平均较正常培养时升高 ($P<0.05$)。结果提示, LV-sh_GSDMD 可降低 OGD/R 后 24 h 小胶质细胞内 caspase-1、IL-1 β 、GSDMD-N 蛋白水平。见表 4,图 4。

表4 各组细胞焦亡相关蛋白水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	GSDMD-N				caspase-1				IL-1 β			
	正常培养	OGD/R 24 h	t 值	P 值	正常培养	OGD/R 24 h	t 值	P 值	正常培养	OGD/R 24 h	t 值	P 值
正常对照组	1.14 $\pm$ 0.06	1.96 $\pm$ 0.24	5.789	0.004	0.060 $\pm$ 0.022	0.365 $\pm$ 0.026	15.520	<0.001	0.244 $\pm$ 0.054	0.608 $\pm$ 0.082	6.380	0.003
阴性对照组	1.03 $\pm$ 0.17	1.91 $\pm$ 0.10	7.613	0.002	0.059 $\pm$ 0.018	0.375 $\pm$ 0.028	16.710	<0.001	0.279 $\pm$ 0.040	0.625 $\pm$ 0.125	4.564	0.010
LV-sh_ GSDMD 组	0.27 $\pm$ 0.12 ^a	0.26 $\pm$ 0.08 ^a	0.197	0.854	0.070 $\pm$ 0.011	0.148 $\pm$ 0.022 ^a	5.453	0.006	0.282 $\pm$ 0.042	0.129 $\pm$ 0.017 ^a	5.927	0.004
F 值	42.490	115.700			0.362	77.150			0.642	31.400		
P 值	<0.001	<0.001			0.711	<0.001			0.559	<0.001		

注: [GSDMD-N] Gasdermin D 蛋白 N 端; [caspase-1] 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; [IL-1 β] 白细胞介素-1 β 。a 示与正常对照组比较, $P<0.05$ 。

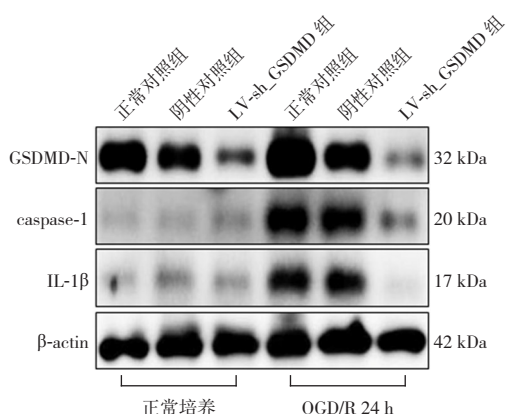


图4 Western blot 法检测慢病毒沉默 GSDMD 转染小胶质细胞 OGD/R 模型建立后 24 h 焦亡相关蛋白 GSDMD-N、caspase-1、IL-1 β 表达电泳图

3 讨论

迄今为止, HIE 仍然缺乏有效的治疗手段。针对 HIE 导致的严重后遗症的预防仍是临床工作中难以攻克的难题。理论上, 针对急性缺血细胞损伤的神经保护剂可以保护脑细胞, 提高对 HIBD 的耐受性, 从目前的研究结果看, 在动物实验中具有疗效的药物, 在临床试验中往往以失败告终。因此, 发现 HIE 新的发病机制, 对于 HIE 的治疗有重要的意义。本研究采用 OGD/R 模型模拟了体内缺氧缺血情况, 观察小胶质细胞焦亡在 HIBD 中的作用。

近年来研究发现, 细胞焦亡是一种由炎症性 caspase 诱发的细胞程序性死亡方式^[14]。在分子水平上, 细胞焦亡主要包括 caspase-1 依赖的经典途径和涉及 caspase-4/5/11 的非经典途径^[15]。NLRP-3/caspase-1 炎性小体作为经典途径细胞焦亡通路

的核心, 目前已被研究得比较清楚^[16]。在识别病原体及内源性危险信号后, NLRP-3 主要通过胞内的钾离子外流、溶酶体裂解及活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 释放等途径活化, 随后通过与凋亡相关点样蛋白及 pro-caspase-1 结合从而组装成 NLRP-3/caspase-1 炎性小体。caspase-1 的激活如何触发焦亡? 有研究发现^[12], GSDMD 可作为 caspase-1 激活细胞焦亡的关键性底物。GSDMD 大约有 480 个氨基酸, 分为 N 端结构域和 C 端结构域, 二者由一长环连接。激活 caspase-1 可有效地切割 GSDMD 连接环位点。GSDMD 在被上游因素激动后, 使其活性 N 端结构域自 C 端结构域上释放出来, 靶向结合脂质膜, 并聚合成一个中空的一环状低聚物, 形成非选择性孔道, 最终导致细胞肿胀, 释放出大量成熟的 IL-1 β 、IL-18 促炎因子, 从而诱发细胞焦亡^[12,17]。

细胞焦亡一般发生在巨噬细胞中, 但也可发生在小胶质细胞中^[18-19]。细胞焦亡可参与多种疾病的进展, 在 HIBD 过程中扮演了重要角色, 例如炎性小体与 HIBD 有着密切的联系, 其可通过多种途径增加促炎因子 IL-1 β 、IL-18 前体的生成及分泌, 并通过 caspase-1 的多样化效应, 诱导脑缺血神经胶质细胞的焦亡^[20]。

在本研究中, 首先通过对大鼠小胶质细胞系 OGD/R 模型制备后各时间点焦亡相关蛋白 GSDMD-N、caspase-1、IL-1 β 表达情况进行观察, 发现在 OGD/R 模型制备完成后的 0 h 即有 GSDMD-N、caspase-1、IL-1 β 表达升高, 并且在 24 h 时间点达到高峰。提示小胶质细胞焦亡参与了 HIBD 的病理生理过程。随后利用慢病毒沉默 GSDMD 转染大鼠小胶质细胞系并且进行

OGD/R 实验,发现沉默 GSDMD 的大鼠小胶质细胞系在 OGD/R 损伤后,其细胞中焦亡相关蛋白 GSDMD-N、caspase-1、IL-1 β 的表达水平发生了下调,伴有 CCK-8 检测发现细胞活性升高,以及 LDH 检测发现细胞毒性降低。这些结果提示,小胶质细胞焦亡加重 HIBD。但是具体分子机制需有待进一步验证,后续我们也将进行进一步地研究。

[参 考 文 献]

- [1] de Vries LS, Jongmans MJ. Long-term outcome after neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2010, 95(3): F220-F224.
- [2] Perlman M, Shah PS. Hypoxic-ischemic encephalopathy: challenges in outcome and prediction[J]. J Pediatr, 2011, 158(2 Suppl): e51-e54.
- [3] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(11): 1387-1394.
- [4] Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar[J]. Nat Neurosci, 2018, 21(1): 9-15.
- [5] Donat CK, Scott G, Gentleman SM, et al. Microglial activation in traumatic brain injury[J]. Front Aging Neurosci, 2017, 9: 208.
- [6] Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated[J]. Exp Neurol, 2016, 275 Pt 3: 316-327.
- [7] Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, et al. Microglia in Alzheimer's disease: activated, dysfunctional or degenerative[J]. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 140.
- [8] Liu F, McCullough LD. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(9): 1121-1130.
- [9] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109.
- [10] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16(7): 407-420.
- [11] Nyström S, Antoine DJ, Lundbäck P, et al. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis[J]. EMBO J, 2013, 32(1): 86-99.
- [12] Liu X, Zhang Z, Ruan J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. Nature, 2016, 535(7610): 153-158.
- [13] Huang S, Gong T, Zhang T, et al. Zhongfenggao protects brain microvascular endothelial cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by angiogenesis[J]. Bio Pharm Bull, 2019, 42(2): 222-230.
- [14] Van Opendenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease[J]. Immunity, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [15] Ruan J, Wang S, Wang J. Mechanism and regulation of pyroptosis-mediated in cancer cell death[J]. Chem Biol Interact, 2020, 323: 109052.
- [16] Martín-Sánchez F, Martínez-García JJ, Muñoz-García M, et al. Lytic cell death induced by melittin bypasses pyroptosis but induces NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β release[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e2984.
- [17] He WT, 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): 1285-1298.
- [18] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, 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.
- [19] McKenzie BA, Mamik MK, Saito LB, et al. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(26): E6065-E6074.
- [20] 王幽梦, 鲁利群, 屈艺. 细胞焦亡与缺氧缺血性脑损伤[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(23): 3998-4001.

(本文编辑: 万静)