

降钙素原对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞 NLRP3 和 caspase-1 表达的影响

蒋文^{1,2} 石丁华¹ 何艳娟¹ 陈淳媛¹

(1. 中南大学湘雅三医院儿科, 湖南长沙 410013; 2. 长沙市第一医院儿科, 湖南长沙 410005)

[摘要] **目的** 探讨降钙素原 (procalcitonin, PCT) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 焦亡相关蛋白核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (caspase-1) 表达的影响。**方法** 以 LPS 诱导 HUVECs 建立脓毒症内皮细胞炎症损伤模型。实验分为两部分: (1) 将 HUVECs 随机分成正常对照组、LPS 组 (浓度 1 $\mu\text{g/mL}$)、PCT 组 (浓度 10 ng/mL) 及 LPS+PCT 组 (各组 $n=3$); (2) 正常对照组、LPS 组、LPS+PCT 不同浓度 (0.1、1、10、100 ng/mL) 组 (各组 $n=3$)。采用实时荧光定量聚合酶链反应法和 Western blot 法检测各组细胞 NLRP3、caspase-1 mRNA 及其蛋白的表达。**结果** (1) 与正常对照组比较, LPS 组、PCT 组及 LPS+PCT 组 NLRP3、caspase-1 mRNA 和蛋白表达均上调 ($P<0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+PCT 组 NLRP3、caspase-1 mRNA 和蛋白表达均下调 ($P<0.05$)。 (2) 与 LPS 组比较, LPS+PCT 不同浓度组 NLRP3、caspase-1 mRNA 和蛋白表达下调; 随 PCT 浓度增加, NLRP3、caspase-1 mRNA 及蛋白表达逐渐下调 ($P<0.05$)。**结论** LPS 可促进 HUVECs 焦亡相关因子 NLRP3、caspase-1 表达, PCT 干预可抑制 LPS 诱导的 HUVECs 中焦亡相关蛋白 NLRP3、caspase-1 的表达, 并呈浓度依赖性。 [中国当代儿科杂志, 2023, 25 (5): 521-526]

[关键词] 脓毒症; 降钙素原; 焦亡; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1; 人脐静脉内皮细胞

Effect of procalcitonin on lipopolysaccharide-induced expression of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 and caspase-1 in human umbilical vein endothelial cells

JIANG Wen, SHI Ding-Hua, HE Yan-Juan, CHEN Chun-Yuan. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China (Chen C-Y, Email: ccyzdh@126.com)

Abstract: Objective To study the effect of procalcitonin (PCT) on lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of the pyroptosis-related proteins nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) and caspase-1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were induced by LPS to establish a model of sepsis-induced inflammatory endothelial cell injury. The experiment was divided into two parts. In the first part, HUVECs were randomly divided into four groups: normal control, LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), PCT (10 ng/mL), and LPS+PCT ($n=3$ each). In the second part, HUVECs were randomly grouped: normal control, LPS, and LPS+PCT of different concentrations (0.1, 1, 10, and 100 ng/mL) ($n=3$ each). Quantitative real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of NLRP3 and caspase-1 in each group. **Results** In the first experiment: compared with the normal control group, the PCT, LPS, and LPS+PCT groups had significantly upregulated mRNA and protein expression levels of NLRP3 and caspase-1 ($P<0.05$); compared with the LPS group, the LPS+PCT group had significantly downregulated mRNA and protein expression levels of NLRP3 and caspase-1 ($P<0.05$). In the second experiment: compared with those in the LPS group, the mRNA and protein expression levels of NLRP3 and

[收稿日期] 2023-01-09; [接受日期] 2023-04-10

[基金项目] 湖南省自然科学基金 (2019JJ40461)。

[作者简介] 蒋文, 女, 硕士研究生, 医师。

[通信作者] 陈淳媛, 女, 主任医师。Email: ccyzdh@126.com。

caspase-1 in the LPS+PCT of different concentrations groups were significantly downregulated in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusions** LPS can promote the expression of the pyroptosis-related proteins NLRP3 and caspase-1 in HUVECs, while PCT can inhibit the LPS-induced expression of the pyroptosis-related proteins NLRP3 and caspase-1 in HUVECs in a concentration-dependent manner.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2023, 25(5): 521-526]

Key words: Sepsis; Procalcitonin; Pyroptosis; Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; Caspase-1; Human umbilical vein endothelial cell

脓毒症是指由于宿主对感染的反应失调，而产生的危及生命的器官功能障碍^[1]。目前脓毒症是全球性的医疗保健问题，也是重症监护室内常见的疾病，以及感染导致死亡的主要原因，在儿童重症监护室内严重脓毒症的全球患病率为8.2%，脓毒症休克的病死率高达40%，甚至更高^[2-3]。脓毒症是一个炎性反应过程，血管内皮细胞损伤是脓毒症发生发展的重要因素。在脓毒症事件中，血管内皮细胞是炎性因子首先攻击的目标^[4-5]，受病原体及内毒素等细菌产物攻击，内皮细胞的损伤是参与脓毒症休克、器官功能障碍及凝血功能障碍的中心环节^[6-8]。

焦亡是一种依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific proteinase, caspase)-1、caspase-4/5介导的，以细胞质膜破裂并释放白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18等促炎性细胞因子引发细胞死亡为特点的细胞程序性死亡方式，也是宿主对抗细菌、真菌、病毒或原生动植物病原体侵袭的一种方式^[9-10]。细胞焦亡的本质是一种炎性宿主反应，研究表明在脓毒症过程中，细胞焦亡一方面起到抗原提呈及清除细胞内病原体的作用，另一方面过度的焦亡激活会加重脓毒症器官功能损害^[11-12]。降钙素原(procalcitonin, PCT)被认为是鉴别细菌感染和病毒感染的重要生物标志物，目前作为脓毒症的潜在生物标记物被广泛研究^[13]。最新研究表明，PCT不仅仅作为脓毒症的重要炎性标志物，也是一种重要的炎性介质^[14]。本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为研究对象，旨在探讨PCT对内皮细胞焦亡相关蛋白表达的影响，为寻找脓毒症致病机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HUVECs系购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection)。人PCT冻干粉(用蒸馏水溶解，配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的母液备用)和

LPS冻干粉(用完全培养基溶解，配制成1 mg/mL 的母液备用)购于美国Sigma公司。DMEM高糖培养基和胎牛血清购于美国Hyclone公司。胰蛋白酶-EDTA消化液和青链霉素混合液购于中国凯基生物公司。RNA提取试剂盒(D9108A)购于美国OMEGA公司。逆转录试剂盒(Rever TraAce q-PCR RT Kit)和实时荧光定量PCR试剂盒(KOD SYBR qPCR Mix)购于日本TOYOBO公司。BCA蛋白质浓度测定试剂盒和SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购于北京碧云天生物科技有限公司。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)兔多克隆抗体和caspase-1兔多克隆抗体购于中国武汉三鹰公司。 β -actin兔多克隆抗体和羊抗兔IgG二抗购于中国博士德生物公司。

1.2 细胞培养

HUVECs用含10%胎牛血清及双抗的高糖DMEM培养基于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱培养，间隔2 d左右换液，当细胞生长达80%~90%时，用胰蛋白酶消化传代。

1.3 实验分组

取对数生长期HUVECs进行分组和干预，培养基中以浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS对细胞干预12 h，建立脓毒症内皮细胞损伤模型^[15]，再用PCT进行干预12 h。实验分为两部分：(1)正常对照组、LPS组(浓度1 $\mu\text{g/mL}$)、PCT组(浓度10 ng/mL)及LPS+PCT组(LPS干预后再用10 ng/mL PCT处理)；(2)正常对照组、LPS组、LPS+PCT不同浓度组(PCT 0.1 ng/mL 组、PCT 1 ng/mL 组、PCT 10 ng/mL 组、PCT 100 ng/mL 组)。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应法检测mRNA表达水平

收集各组细胞，按RNA提取试剂盒说明书提取总RNA，分光光度计检测RNA的浓度和纯度。采用逆转录试剂盒按说明书将RNA逆转录成cDNA。根据试剂盒(KOD SYBR qPCR Mix)说明书，取1 μL cDNA进行PCR扩增。PCR扩增反应条件：98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min；98 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火

10 s, 68℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。以 *GAPDH* 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物由湖南擎科生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。实验独立重复 3 次。

表 1 *NLRP3*、*caspase-1* 和 *GAPDH* 基因引物序列

基因名称	序列 (5'→3')	片段长度 (bp)
<i>NLRP3</i>	F: GGAGAATGCCTTGGGAGACT	195
	R: CCCTTGTCTCCGAGAGTGTT	
<i>caspase-1</i>	F: TTTATCGCTTTTCTGCTCTTC	200
	R: GTCACCTCTTTCAGTGCTGGG	
<i>GAPDH</i>	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAT	106
	R: GGCTGTTGTGCTACTTCTCATGG	

1.5 Western blot 法检测蛋白表达水平

收集各组细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性, 根据 SDS 制胶试剂盒说明书制胶, 蛋白凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜。用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 1 : 1 000 稀释的兔抗人 *NLRP3*、兔抗人 *caspase-1*、兔抗人 β -actin 一抗 4℃ 振荡孵育过夜。PBST 漂洗 3 次, 加

入 1 : 5 000 稀释的羊抗兔二抗室温振荡孵育 2 h, PBST 漂洗 3 次, ECL 化学发光显色。使用 Image J 8.0 软件对蛋白条带进行灰度值分析。实验独立重复 3 次。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCT 干预对 LPS 诱导的 HUVECs 中 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达的影响

与正常对照组比较, LPS 组、PCT 组及 LPS+PCT 组 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达均上调 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+PCT 组 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达下调 ($P < 0.05$); LPS+PCT 组与 PCT 组各指标的比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 各组细胞 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	mRNA		蛋白	
	<i>NLRP3</i>	<i>caspase-1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>caspase-1</i>
正常对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01
LPS 组	1.85 $\pm$ 0.13 ^a	1.51 $\pm$ 0.04 ^a	0.39 $\pm$ 0.03 ^a	0.31 $\pm$ 0.03 ^a
PCT 组	1.38 $\pm$ 0.03 ^a	1.18 $\pm$ 0.03 ^a	0.22 $\pm$ 0.03 ^a	0.12 $\pm$ 0.01 ^a
LPS+PCT 组	1.46 $\pm$ 0.05 ^{a,b}	1.28 $\pm$ 0.07 ^{a,b}	0.27 $\pm$ 0.01 ^{a,b}	0.25 $\pm$ 0.02 ^{a,b}
<i>F</i> 值	14.87	15.00	13.56	22.74
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	0.02	0.01

注: [LPS] 脂多糖; [PCT] 降钙素原; [NLRP3] 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; [caspase-1] 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1。a 示与正常对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 LPS 组比较, $P < 0.05$ 。

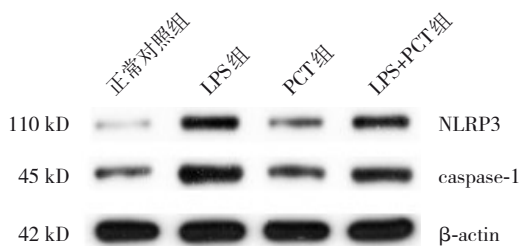


图 1 Western blot 法检测各组 *NLRP3*、*caspase-1* 蛋白表达电泳图

2.2 不同浓度 PCT 干预对 LPS 诱导的 HUVECs 中 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达的影响

与正常对照组比较, LPS 组及 PCT 不同浓度组 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达均上调 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, PCT 不同浓度组 *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达均下调 ($P < 0.05$), 随着 PCT 浓度增加, *NLRP3*、*caspase-1* mRNA 及蛋白表达逐渐下调, 不同浓度的 PCT 各组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3、图 2。

表 3 各组细胞 NLRP3、caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	mRNA		蛋白	
	NLRP3	caspase-1	NLRP3	caspase-1
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.02
LPS 组	2.31 ± 0.07 ^a	1.41 ± 0.03 ^a	0.35 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.02 ^a
PCT 0.1 ng/mL 组	1.91 ± 0.04 ^{a,b}	1.25 ± 0.02 ^{a,b}	0.29 ± 0.03 ^{a,b}	0.47 ± 0.03 ^{a,b}
PCT 1 ng/mL 组	1.61 ± 0.03 ^{a,b,c}	1.17 ± 0.02 ^{a,b,c}	0.24 ± 0.02 ^{a,b,c}	0.41 ± 0.02 ^{a,b,c}
PCT 10 ng/mL 组	1.52 ± 0.03 ^{a,b,c,d}	1.10 ± 0.02 ^{a,b,c,d}	0.21 ± 0.01 ^{a,b,c,d}	0.37 ± 0.03 ^{a,b,c,d}
PCT 100 ng/mL 组	1.44 ± 0.04 ^{a,b,c,d,e}	1.04 ± 0.01 ^{a,b,c,d,e}	0.13 ± 0.02 ^{a,b,c,d,e}	0.22 ± 0.01 ^{a,b,c,d,e}
F 值	21.69	27.06	25.18	22.05
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: [LPS] 脂多糖; [PCT] 降钙素原; [NLRP3] 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; [caspase-1] 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1。a 示与正常对照组比较, $P<0.05$; b 示与 LPS 组比较, $P<0.05$; c 示与 PCT 0.1 ng/mL 组比较, $P<0.05$; d 示与 PCT 1 ng/mL 组比较, $P<0.05$; e 示与 PCT 10 ng/mL 组比较, $P<0.05$ 。

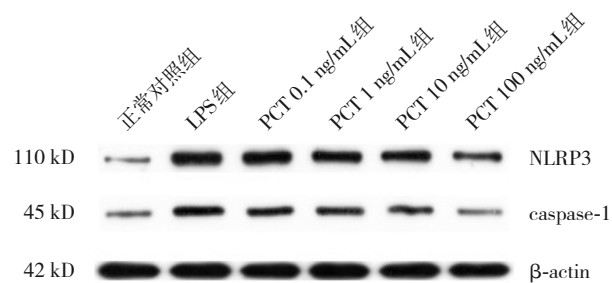


图 2 Western blot 法检测各组 NLRP3、caspase-1 蛋白表达电泳图

3 讨论

在脓毒症事件中, 血管内皮细胞是该过程的主要靶细胞, 内皮细胞与炎性介质、先天性免疫成分及凝血系统处于动态平衡状态来协调宿主的反应。血管内皮细胞的损伤、功能障碍在脓毒症的一系列不良后果中发挥着重要作用^[16-17]。焦亡是依赖于 caspase 激活的另一种细胞程序性死亡的方式, 是依赖 NLRP3 炎性小体、caspase-1 及 Gasdermin D (GSDMD) 蛋白活化后促进 IL-1 β 、IL-18 等促炎性物质成熟及释放的促炎过程^[10, 18-19]。细胞焦亡破坏体内受感染的细胞, 促使感染细胞内病原体释放, 同时释放一系列炎性因子, 从而被免疫细胞识别、吞噬及杀灭, 在机体内起到抗原提呈及清除细胞内病原体的作用^[20-21]。因此, 适度的细胞焦亡是保护机体抵御病原微生物感染的重要方式, 但是过度的细胞焦亡激活可能会加重脓毒性休克和脓毒症器官损害。血管内皮细胞的炎性损伤是脓毒症病理过程中的关键, 而细胞焦亡是感染性疾病中的重要调节机制。在脓毒症急性肺损伤机制的研究中表明, GSDMD 蛋白由

LPS 刺激的单核细胞释放, 与 NLRP3 炎性小体活化后的 caspase-1 结合形成微粒, GSDMD 蛋白被 caspase-1 切割后活化, 活化后的 GSDMD 蛋白在肺血管内皮细胞上打孔, 破坏细胞膜的完整性, 对内皮细胞产生损伤^[22]。这提示血管内皮细胞的焦亡可能是脓毒症疾病过程重要病理机制之一。PCT 的血清浓度被认为是全身感染性疾病的严重程度及预后的生物学标志物。而目前研究发现, PCT 本身存在细胞毒性, 且有研究表明在脓毒症肝衰竭的过程中其可能担任了炎性介质的重要角色^[23-24]。细胞焦亡的本质是促炎过程, 而脓毒症的发生发展也是一个炎症放大的过程, PCT 作为脓毒症过程中的重要生物学标志物, 在脓毒症细胞焦亡机制中是促炎因子或保护因子, 目前尚不清楚。

本研究发现, 在 LPS 诱导的脓毒症内皮细胞炎症损伤模型中, 与正常对照组比较, LPS 组焦亡相关蛋白 NLRP3 及 caspase-1 mRNA、蛋白表达均上调, 说明 LPS 诱导的细胞焦亡参与了脓毒症发病机制。有研究表明, 在盲肠结扎穿刺诱导的脓毒症心肌功能障碍的小鼠模型中, 小鼠心肌细胞匀浆中的 NLRP3 及 caspase-1 mRNA 表达水平增高, 同样在体外试验中证实, 将小鼠心肌细胞暴露在 LPS 中, NLRP3 及 caspase-1 mRNA 表达水平也增高, 本研究结果与之一致。而随着 NLRP3 炎性小体的激活, IL-1 β 及 IL-18 等炎症因子也随即增高^[25]。以上结果提示, 脓毒症时细菌或细菌产物的刺激激活了 NLRP3 炎性小体, 从而进一步介导了炎症反应。在心肌缺血-再灌注损伤引起的无菌性炎症的研究中发现, 在心肌梗死早期 NLRP3 炎性小体激活, 进一步激活 caspase-1, 募集循环中的白细胞对损伤细胞进行吞噬, 最后对心肌细胞的缺血

损伤起到了一定的修复作用^[26]。因此,细胞焦亡在某些炎症过程中起到了一定的保护作用,但过度的炎性物质释放可加重组织损伤。

本研究用不同浓度的 PCT (0.1、1、10、100 ng/mL) 对 LPS 诱导的脓毒症 HUVECs 模型干预 12 h,发现 PCT 使正常 HUVECs 中 NLRP3、caspase-1 表达上调,而对 LPS 诱导的 HUVECs 中 NLRP3、caspase-1 表达有抑制作用,提示 PCT 对正常细胞焦亡和脓毒症模型细胞焦亡有不同作用机制。Sauer 等^[23]在脓毒症肝衰竭的体外实验中发现,将人肝癌细胞暴露在浓度为 0.01~50 ng/mL 的 PCT 中会诱导细胞坏死,并降低代谢活性、细胞完整性、合成和解毒能力,而同时使用 L929 成纤维细胞获得同样的实验结果。在危重患者研究中发现,PCT 的升高促使了线粒体功能的障碍,使细胞代谢发生改变,同时促进了内皮细胞上促炎介质的释放,激活单核细胞、巨噬细胞和 T 细胞等免疫细胞,对内皮细胞屏障功能产生损害^[27]。以上结果提示,PCT 通过启动细胞焦亡、坏死或直接对细胞产生损伤,存在一定细胞毒性,在炎症介导的过程中起促进作用。PCT 对 LPS 干预后 HUVECs 中 NLRP3 及 caspase-1 表达又有一定抑制作用,并呈浓度依赖性,提示 PCT 在脓毒症细胞模型中对细胞焦亡又有抑制作用。Hoffmann 等^[28]发现脓毒症休克的血管平滑肌细胞模型中,PCT 在转录水平上抑制 LPS 介导的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 合成。将人全血细胞与 LPS 和 PCT 同时孵育可抑制 LPS 诱导的 TNF- α 产生^[29]。以上结果表明 PCT 在一定程度上通过抑制焦亡或通过减少 TNF- α 产生抑制炎症过程,PCT 作为一种炎症调节剂,在 LPS、TNF- α 和干扰素 γ 等激动剂引发的炎症反应过程中起重要作用^[30]。因此,PCT 可使正常 HUVECs 中 NLRP3、caspase-1 表达上调,而使 LPS 诱导的 HUVECs 中 NLRP3、caspase-1 表达下调,提示 PCT 可能通过细胞焦亡参与脓毒症发病机制,对正常和病理 HUVECs 的 NLRP3、caspase-1 表达调控机制可能存在差异,在脓毒症中 PCT 可能具有致炎和抗炎双重作用,其作用机制及介导的通路,需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Schlappbach LJ. Paediatric sepsis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2019, 32(5): 497-504. PMID: 31335441. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000583.
- [2] Emr BM, Alcamo AM, Carcillo JA, et al. Pediatric sepsis update: how are children different? [J]. Surg Infect (Larchmt), 2018, 19(2): 176-183. PMID: 29394150. DOI: 10.1089/sur.2017.316.
- [3] Garcia PCR, Tonial CT, Piva JP. Septic shock in pediatrics: the state-of-the-art[J]. J Pediatr (Rio J), 2020, 96(Suppl 1): 87-98. PMID: 31843507. PMCID: PMC9432279. DOI: 10.1016/j.jpeds.2019.10.007.
- [4] Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis[J]. Crit Care, 2019, 23(1): 16. PMID: 30654825. PMCID: PMC6337861. DOI: 10.1186/s13054-018-2292-6.
- [5] Iba T, Levy JH. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis[J]. J Thromb Haemost, 2019, 17(2): 283-294. PMID: 30582882. DOI: 10.1111/jth.14371.
- [6] Li ZF, Wang YC, Feng QR, et al. Inhibition of the C3a receptor attenuates sepsis-induced acute lung injury by suppressing pyroptosis of the pulmonary vascular endothelial cells[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 184: 208-217. PMID: 35367342. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.032.
- [7] Le KTT, Chu X, Jaeger M, et al. Leukocyte-released mediators in response to both bacterial and fungal infections trigger IFN pathways, independent of IL-1 and TNF- α , in endothelial cells[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2508. PMID: 31708927. PMCID: PMC6824321. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02508.
- [8] Chang JC. Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease[J]. Thromb J, 2019, 17: 10. PMID: 31160889. PMCID: PMC6542012. DOI: 10.1186/s12959-019-0198-4.
- [9] Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1106-1121. PMID: 33785842. PMCID: PMC8008022. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.
- [10] Li S, Sun Y, Song M, et al. NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression[J]. JCI insight, 2021, 6(23): e146852. PMID: 34877938. PMCID: PMC8675200. DOI: 10.1172/jci.insight.146852.
- [11] Qu M, Wang Y, Qiu Z, et al. Necroptosis, pyroptosis, ferroptosis in sepsis and treatment[J]. Shock, 2022, 57(6): 161-171. PMID: 35759299. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001936.
- [12] Wen R, Liu YP, Tong XX, et al. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis in sepsis and sepsis-associated organ dysfunction[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 962139. PMID: 35967871, PMCID: PMC9372372, DOI: 10.3389/fcimb.2022.962139.
- [13] Velissaris D, Zareifopoulos N, Lagadinou M, et al. Procalcitonin and sepsis in the emergency department: an update[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(1): 466-479. PMID: 33506938. DOI: 10.26355/eurrev_202101_24416.
- [14] Downes KJ, Fitzgerald JC, Weiss SL. Utility of procalcitonin as a biomarker for sepsis in children[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(7): e01851-19. PMID: 32350044. PMCID: PMC7315022. DOI: 10.1128/JCM.01851-19.

- [15] Long D, Yang J, Wu X, et al. Urokinase-type plasminogen activator protects human umbilical vein endothelial cells from apoptosis in sepsis. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(1): 77-86. PMID: 31933722; PMCID:PMC6944024.
- [16] Joffe J, Hellman J, Ince C, et al. Endothelial responses in sepsis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(3): 361-370. PMID: 32101446. DOI: 10.1164/rccm.201910-1911TR.
- [17] Pons S, Arnaud M, Loisele M, et al. Immune consequences of endothelial cells' activation and dysfunction during sepsis[J]. *Crit Care Clin*, 2020, 36(2): 401-413. PMID: 32172821. DOI: 10.1016/j.ccc.2019.12.001.
- [18] Wang Q, Wu J, Zeng Y, et al. Pyroptosis: a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 510: 62-72. PMID: 32622968. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.044.
- [19] Li Z, Jia Y, Feng Y, et al. Methane alleviates sepsis-induced injury by inhibiting pyroptosis and apoptosis: in vivo and in vitro experiments[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(4): 1226-1239. PMID: 30779706. PMCID: PMC6402521. DOI: 10.18632/aging.101831.
- [20] Du T, Gao J, Li P, et al. Pyroptosis, metabolism, and tumor immune microenvironment[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(8): e492. PMID: 34459122. PMCID: PMC8329701. DOI: 10.1002/ctm2.492.
- [21] Hsu SK, Li CY, Lin IL, 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. PMID: 34522213. PMCID: PMC8419056. DOI: 10.7150/thno.62521.
- [22] Mitra S, Exline M, Habyarimana F, et al. Microparticulate caspase 1 regulates gasdermin D and pulmonary vascular endothelial cell injury[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59(1): 56-64. PMID: 29365280. PMCID: PMC6039876. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0393OC.
- [23] Sauer M, Doß S, Ehler J, et al. Procalcitonin impairs liver cell viability and function in vitro: a potential new mechanism of liver dysfunction and failure during sepsis?[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 6130725. PMID: 28255555. PMCID: PMC5309405. DOI: 10.1155/2017/6130725.
- [24] Rule JA, Hynan LS, Attar N, et al. Procalcitonin identifies cell injury, not bacterial infection, in acute liver failure[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138566. PMID: 26393924. PMCID: PMC4579124. DOI: 10.1371/journal.pone.0138566.
- [25] Kalbitz M, Fattahi F, Grailer JJ, et al. Complement-induced activation of the cardiac NLRP3 inflammasome in sepsis[J]. *FASEB J*, 2016, 30(12): 3997-4006. PMID: 27543123. PMCID: PMC5102118. DOI: 10.1096/fj.201600728R.
- [26] Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-H1568. PMID: 30168729. PMCID: PMC6336966. DOI: 10.1152/ajpheart.00158.2018.
- [27] Kobayashi H, Amrein K, Lasky-Su JA, et al. Procalcitonin metabolomics in the critically ill reveal relationships between inflammation intensity and energy utilization pathways[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23194. PMID: 34853395. PMCID: PMC8636627. DOI: 10.1038/s41598-021-02679-0.
- [28] Hoffmann G, Schobersberger W. Anti-inflammatory procalcitonin (PTC) in a human whole blood model septic shock[J]. *Cytokine*, 2001, 14(2): 127-128. PMID: 11356014. DOI: 10.1006/cyto.2000.0853.
- [29] Monneret G, Pachot A, Laroche B, et al. Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced tnfr production by human circulating blood cells[J]. *Cytokine*, 2000, 12(6): 762-764. PMID: 10843760. DOI: 10.1006/cyto.1999.0607.
- [30] Hoffmann G, Czechowski M, Schloesser M, et al. Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(9): 2091-2095. PMID: 12352046. DOI: 10.1097/00003246-200209000-00023.

(本文编辑: 杨丹)