

# 细胞焦亡参与脑缺血再灌注损伤的初步研究\*

余 颜<sup>1</sup>, 胡雨琴<sup>1</sup>, 张 荆<sup>1</sup>, 蒿玉兴<sup>1</sup>, 蔡 媛<sup>1</sup>, 张 蝓蝓<sup>1</sup>, 王睿智<sup>1</sup>, 邓常清<sup>1△</sup>, 刘新春<sup>2△</sup>  
(<sup>1</sup>湖南中医药大学血管生物学实验室, 湖南长沙 410208; <sup>2</sup>湖南中医药大学高等专科学校附属第一医院, 湖南株洲 412000)

**[摘要]** **目的:** 探讨细胞焦亡在脑缺血再灌注后不同时点海马和皮质区的变化, 从 NLRP3 炎症小体介导的经典焦亡途径探讨其机制, 分析细胞焦亡在脑内不同部位损伤中的作用。**方法:** SD 大鼠随机分成假手术组 (sham 组) 与模型组 (MCAO/R 组), 模型组又分为脑缺血再灌注 6 h 组 (MCAO/R 6 h 组)、12 h 组 (MCAO/R 12 h 组) 和 24 h 组 (MCAO/R 24 h 组)。右侧改良线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血-再灌注模型。采用神经功能评分、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色法和形态学观察评价神经细胞损伤程度; TUNEL 和 caspase-1 免疫荧光双染检测细胞焦亡; Western blot 法检测 NLRP3、cleaved caspase-1、pro-caspase-1 和白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 蛋白的表达。**结果:** 脑缺血再灌注后不同时间均出现神经功能损伤, TTC 染色显示随着再灌注时间的延长, 脑梗死体积逐渐增大 ( $P < 0.05$ )。海马 CA1 区及皮质区出现组织结构疏松, 间质水肿, 神经细胞排列紊乱, 胞核染色加深, 细胞核碎裂, 细胞数量减少等细胞死亡的典型形态学特征。免疫荧光双染检测表明, 脑缺血再灌注后不同时点均出现细胞焦亡现象, 海马 CA1 区和皮质区在再灌注 12 h 和 24 h 时最明显 ( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果表明, NLRP3 介导细胞经典焦亡通路中的 NLRP3、cleaved caspase-1 和 pro-caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达在脑缺血再灌注后均不同程度上调, NLRP3 蛋白在海马区再灌注 12 h 和 24 h 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), 皮质区再灌注 6 h 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ); pro-caspase-1 蛋白在海马区再灌注各个时点表达均明显增高 ( $P < 0.05$ ), 皮质区再灌注 24 h 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ); cleaved caspase-1 蛋白在海马区再灌注 12 h 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ), 皮质区再灌注 24 h 表达明显增高 ( $P < 0.05$ ); IL-1 $\beta$  蛋白表达在海马区再灌注 24 h 明显增高 ( $P < 0.05$ ), 皮质区再灌注 6 h 表达增高 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 细胞焦亡参与了脑缺血再灌注后神经细胞损伤, 经典焦亡途径在海马和皮质区均发挥重要调控作用, 以海马区尤为明显, 提示海马区是脑缺血再灌注后细胞焦亡和炎症反应诱发的继发性神经损伤的主要部位。

**[关键词]** 脑缺血再灌注损伤; 细胞焦亡; NLRP3 炎症小体; Caspase-1

**[中图分类号]** R743.3; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.08.006

## Preliminary study on pyroptosis involved in cerebral ischemia-reperfusion injury

SHE Yan<sup>1</sup>, HU Yu-qin<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>, HAO Yu-xing<sup>1</sup>, CAI Yuan<sup>1</sup>, ZHANG Guo-guo<sup>1</sup>, WANG Rui-zhi<sup>1</sup>, DENG Chang-qing<sup>1</sup>, LIU Xing-chun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory of Vascular Biology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; <sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412000, China. E-mail: dchangq@sohu.com; 1127524084@qq.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the changes of pyroptosis in hippocampus and cortex at different time points after cerebral ischemia-reperfusion, and to explore its mechanism from NLRP3-mediated classical pyroptosis pathway, and to analyze the role of pyroptosis in different parts of cerebral injury. **METHODS:** SD rats were randomly divided into sham operation group (sham group) and model group (MCAO/R group). The rats in model group was further divided into cerebral ischemia-reperfusion 6 h group (MCAO/R 6 h group), 12 h group (MCAO/R 12h group) and 24 h group (MCAO/R 24 h group). The rat model was established on rats by middle cerebral artery occlusion and reperfusion (MCAO/R) induced by modified right-side thread method. Neurologic function score, 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and morphological observation were used to evaluate the degree of nervous cell injury. TUNEL and caspase-1 immuno-

[收稿日期] 2018-09-18 [修回日期] 2019-01-09

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81603415); 湖南省自然科学基金资助项目 (No. 2017JJ2321); 湖南省中医药管理局重点项目 (No. 201820); 湖南省教育厅科研项目 (No. 15C1034); 2016 年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划 (No. 959)

△通讯作者 邓常清 Tel: 0731-88458210; E-mail: dchangq@sohu.com; 刘新春 Tel: 0731-28290012; E-mail: 1127524084@qq.com

fluorescence double staining were used to detect pyroptosis. The protein expression of NLRP3, cleaved caspase-1, pro-caspase-1 and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was determined by Western blot. **RESULTS:** Neurological damage occurred at different times after cerebral ischemia-reperfusion. TTC staining showed that the volume of cerebral infarction gradually increased with the prolongation of reperfusion time ( $P < 0.05$ ). The hippocampal CA1 area and cortical area showed typical morphological features such as loose tissue structure, interstitial edema, disordered arrangement of nerve cells, deepening of nucleus staining, nuclear fragmentation and decreased cell number. Immunofluorescence double staining showed that there was a phenomenon of pyroptosis at different time after cerebral ischemia-reperfusion. The pyroptosis of hippocampal CA1 and cortical area was most obvious at 12 h and 24 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that the expression of NLRP3, cleaved caspase-1, pro-caspase-1 and IL-1 $\beta$  in NLRP3-mediated classic pyroptosis pathway was regulated in different degrees after cerebral ischemia-reperfusion. The protein expression of NLRP3 in hippocampus was significantly increased at 12 h and 24 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of NLRP3 in cortex was significantly increased at 6 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ). The protein expression of pro-caspase-1 in hippocampus was significantly increased at each time points of reperfusion ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of pro-caspase-1 in the cortex was significantly increased at 24 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ). The protein expression of cleaved caspase-1 in the hippocampus was significantly increased at 12 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ), and increased in the cortex at 24 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ). The protein expression of IL-1 $\beta$  in the hippocampus was significantly increased at 24 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ), and increased in the cortex at 6 h after reperfusion ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Pyroptosis is involved in neuronal injury after cerebral ischemia-reperfusion. The classic pyroptosis pathway plays an important regulatory role in hippocampus and cortex, especially in hippocampus, suggesting that hippocampus is the main part of secondary nerve impairment induced by pyroptosis and inflammation after cerebral ischemia-reperfusion.

[ **KEY WORDS** ] Cerebral ischemia-reperfusion injury; Pyroptosis; NLRP3 inflammasome; Caspase-1

脑缺血再灌注损伤的病理生理机制是一系列复杂的神经损伤级联反应,神经细胞的死亡贯穿整个损伤过程。细胞焦亡是近年来发现并证实的一种典型依赖于炎症反应的程序性细胞死亡方式。经典焦亡途径依赖于 caspase-1 激活后诱导的炎症反应,内源性和外源性刺激信号通过不同途径作用于炎症小体而激活 caspase-1,介导细胞渗透性肿胀破裂,形成膜孔,胞内物质(如乳酸脱氢酶等)流出,白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 IL-18 前体裂解并诱导其它炎症因子、黏附分子等的合成和释放,放大局部和全身炎症反应,诱导细胞焦亡的发生<sup>[1-3]</sup>。炎症小体的活化是细胞焦亡调控的经典途径,是细胞焦亡调控的核心环节,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) 炎症小体是通过 caspase-1 与含 CARD 结构域的凋亡相关颗粒样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 等相互作用而构成的蛋白复合体,可诱导细胞焦亡的发生<sup>[4-5]</sup>。NLRP3 炎症小体同样作为脑缺血后中枢神经系统无菌性炎症反应的始动因子,在中枢神经系统中诱导细胞焦亡和炎症反应,导致神经细胞的损伤,在中枢神经系统细胞焦亡中发挥关键作用<sup>[6-7]</sup>。在脑缺血再灌注中,细胞焦亡及其调控机制与神经系统损伤有何种关系还不清楚,因此,本文研究脑缺血再灌注后不同时间点海马和皮质区细胞焦亡的变化特点,以进一步明确神经细胞焦亡在脑

缺血再灌注损伤发生发展中的意义。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只,体重 240 ~ 260 g,由湖南维通利华实验动物有限公司提供,动物合格证号为 SCXK (湘)2009-0004。饲养于 SPF 级动物实验室内,湿度 45%、室温 25 ℃。动物实验经湖南中医药大学伦理委员会批准。

### 2 主要试剂和仪器

兔抗鼠 cleaved caspase-1、IL-1 $\beta$  和 NLRP3 多克隆抗体及 Alexa Fluor 594 标记的山羊抗兔 IgG 购自 Proteintech;兔抗鼠 pro-caspase-1 单克隆抗体购自 Abcam;兔抗鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自北京中杉金桥;TUNEL 荧光试剂盒购自凯基生物;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥;TTC 购自 Sigma。CM185 恒冷箱冰冻切片仪购自 Leica;荧光显微镜购自 Carl Zeiss;ChemiDoc XRS 高灵敏度化学发光成像系统购自 Bio-Rad。

### 3 方法

**3.1 动物分组及造模** 参照 Longa 等<sup>[8]</sup>报道的方法进行改良建立右侧大脑中动脉阻塞局灶性脑缺血再灌注 (middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R) 模型。脑缺血 2 h 后拔出线栓恢复血流实现再灌注。分别在脑缺血再灌注后的 3 个时点

(6 h、12 h 和 24 h)麻醉处死动物检测。假手术组仅手术分离颈总动脉,不放线栓。

将 80 只大鼠随机分成假手术组 (sham 组) 和模型组 (MCAO/R 组), 模型组按脑缺血再灌注后不同时间再分成脑缺血再灌注 6 h 组 (MCAO/R 6 h 组)、脑缺血再灌注 12 h 组 (MCAO/R 12 h 组) 和脑缺血再灌注 24 h 组 (MCAO/R 24 h 组), 每组各 20 只。

**3.2 神经功能评分** 根据 Longa 5 级 4 分法对各个时点大鼠进行神经功能评分, 模型纳入标准为神经功能评分 1~3 分, 模型剔除标准为神经功能评分为 0 分或 4 分。

**3.3 脑梗死体积的测定** 采用 TTC 染色法测定。大鼠处死后取完整脑组织, 去除小脑和脑干, 将脑组织置于冰生理盐水中置  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻 20 min, 取出后放入专用脑槽切片模具中, 按 2 mm 的厚度沿冠状位切片, 将脑组织切片放入 2% TTC 液中,  $37^{\circ}\text{C}$  温育 15 min, 使脑片均匀染色。染色后取出脑片浸入 4% 多聚甲醛中固定过夜, 固定好的脑片取出晾干按顺序拍照。Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定各脑片的缺血区 (呈白色) 面积, 并根据脑片厚度计算缺血区体积。

**3.4 脑组织病理形态观察** 采用 HE 染色观察海马及皮质区形态特征。将脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 在全自动脱水机上进行组织脱水, 石蜡包埋。连续切取  $5\ \mu\text{m}$  厚冠状切片, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后封片观察。在显微镜下观察海马及皮质区神经细胞形态, 以判断神经细胞损伤程度。

**3.5 神经细胞焦亡的测定** 采用 caspase-1 和 TUNEL 免疫荧光双染法检测大鼠海马及皮质区神经细胞焦亡。大鼠先用生理盐水灌注, 待肝脏颜色变浅后, 经心脏灌注 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 250 mL 固定, 取脑组织作冰冻切片, 按顺序滴加  $50\ \mu\text{L}$  TdT 酶反应液 ( $45\ \mu\text{L}$  equilibration buffer 加  $1.0\ \mu\text{L}$  biotin-11-dUTP 和  $4.0\ \mu\text{L}$  TdT enzyme) 和 streptavidin-FITC 标记工作液, 孵育 I 抗 (cleaved caspase-1: 1: 50),  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 孵育 II 抗 (抗兔-IgG 标记荧光抗体: 1: 100), DAPI 工作液  $37^{\circ}\text{C}$  染核, 暗室中甘油封片。荧光显微镜下取海马及皮质区观察拍照。Cleaved caspase-1 荧光呈红色, 胞浆和胞核均有表达; TUNEL 的荧光呈绿色, 在胞核中表达; 蓝色荧光为同视野下的细胞核。选取海马 CA1 区及皮质区同一部位, 计数细胞共表达率 (3 色重叠细胞/蓝色荧光细胞) 作为阳性细胞, 计算细胞焦亡阳性细胞率。

**3.6 NLRP3、cleaved caspase-1、pro-caspase-1 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达的测定** 采用 Western blot 检测海马及皮质区 NLRP3、cleaved caspase-1、pro-caspase-1 和

IL-1 $\beta$  蛋白表达。分别分离海马及皮质区, 加蛋白裂解液提取脑组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取  $50\ \mu\text{g}$  蛋白样品煮沸变性, 行 SDS-PAGE, 转膜, 5% 的脱脂奶粉  $37^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h。加入稀释的 I 抗 (NLRP3: 1: 300; cleaved caspase-1: 1: 500; pro-caspase-1: 1: 100 和 IL-1 $\beta$ : 1: 200) 及抗  $\beta$ -actin 的 I 抗 (1: 100),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日用 TBST 漂洗膜 3 次, 将膜放入已用封闭液稀释的 II 抗中, 室温孵育 1 h。洗涤后 ECL 显影, 凝胶成像仪照相, QuantityOne 软件测定各目的条带的吸光度 (IA 值), 分别以 NLRP3、cleaved caspase-1、pro-caspase-1、IL-1 $\beta$  的 IA 与  $\beta$ -actin 的 IA 的比值对目的蛋白的表达进行相对定量。

#### 4 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学处理。所有数据均用均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。各组计量资料比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 脑缺血再灌注后不同时点脑梗死体积的变化

假手术组未见白色的梗死灶。脑缺血再灌注后大脑皮质出现梗死区, MCAO/R 6 h 组、12 h 组和 24 h 组的梗死体积显著大于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 且随着再灌注时间的增加, 梗死体积进一步增加, 与 MCAO/R 6 h 组比较, MCAO/R 12 h 组和 24 h 组的脑梗死体积显著增大 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

### 2 脑缺血再灌注后不同时点海马 CA1 区和皮质区神经细胞病理形态学的变化

HE 染色显示, 假手术组大鼠海马区及皮质区神经细胞呈圆形或锥体形, 排列整齐致密, 胞核饱满, 核仁明显, 边界清晰; 脑缺血再灌注后, 脑组织结构疏松, 间质水肿, 神经细胞肿胀, 排列紊乱, 细胞核固缩, 碎裂, 神经细胞数量明显减少, 呈细胞死亡的典型特征, 尤其在 MCAO/R 12 h 组和 24 h 组变化显著, 见图 2。

### 3 脑缺血再灌注后不同时点海马 CA1 区和皮质区神经细胞焦亡的变化

以 cleaved caspase-1 (呈红色) 和 TUNEL (呈绿色) 的共表达计数细胞共表达率 (3 色重叠细胞/蓝色荧光细胞) 反映细胞焦亡。假手术组可见少量的共表达焦亡细胞。脑缺血再灌注后, 海马 CA1 区和皮质区焦亡细胞显著多于假手术组 ( $P < 0.05$ )。随着再灌注时间的延长, 焦亡细胞率增加, 其中, 在海马 CA1 区和皮质区, MCAO/R 12 h 组和 MCAO/R 24 h 组的焦亡细胞率大于 MCAO/R 6 h 组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

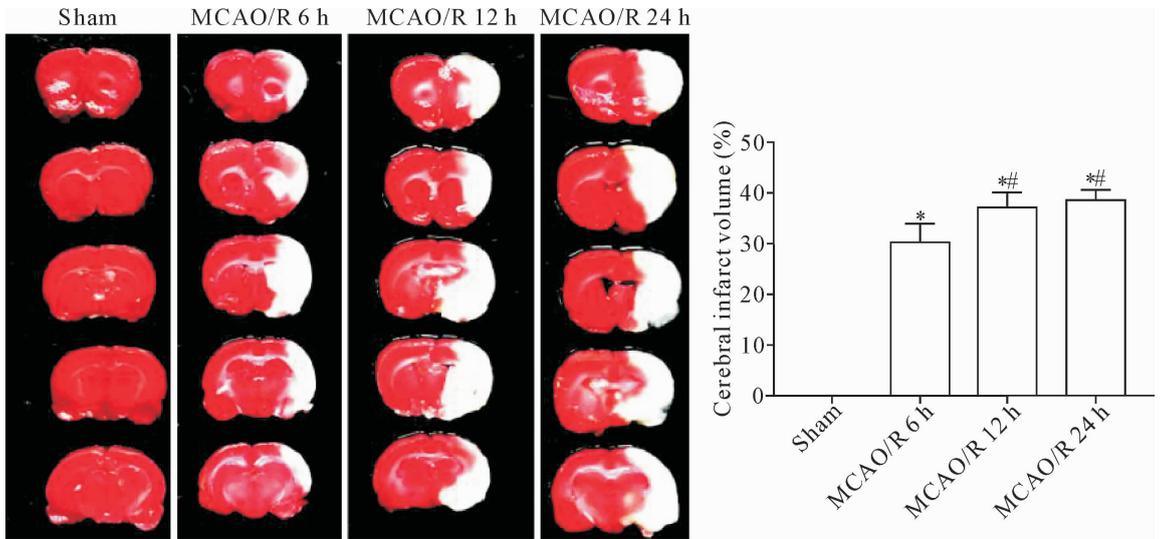


Figure 1. The changes of cerebral infarction volumes at different time points after cerebral ischemia reperfusion. Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ .

\*  $P < 0.05$  vs sham group; #  $P < 0.05$  vs MCAO/R 6 h group.

图1 脑缺血再灌注后不同时间点脑梗死体积的变化

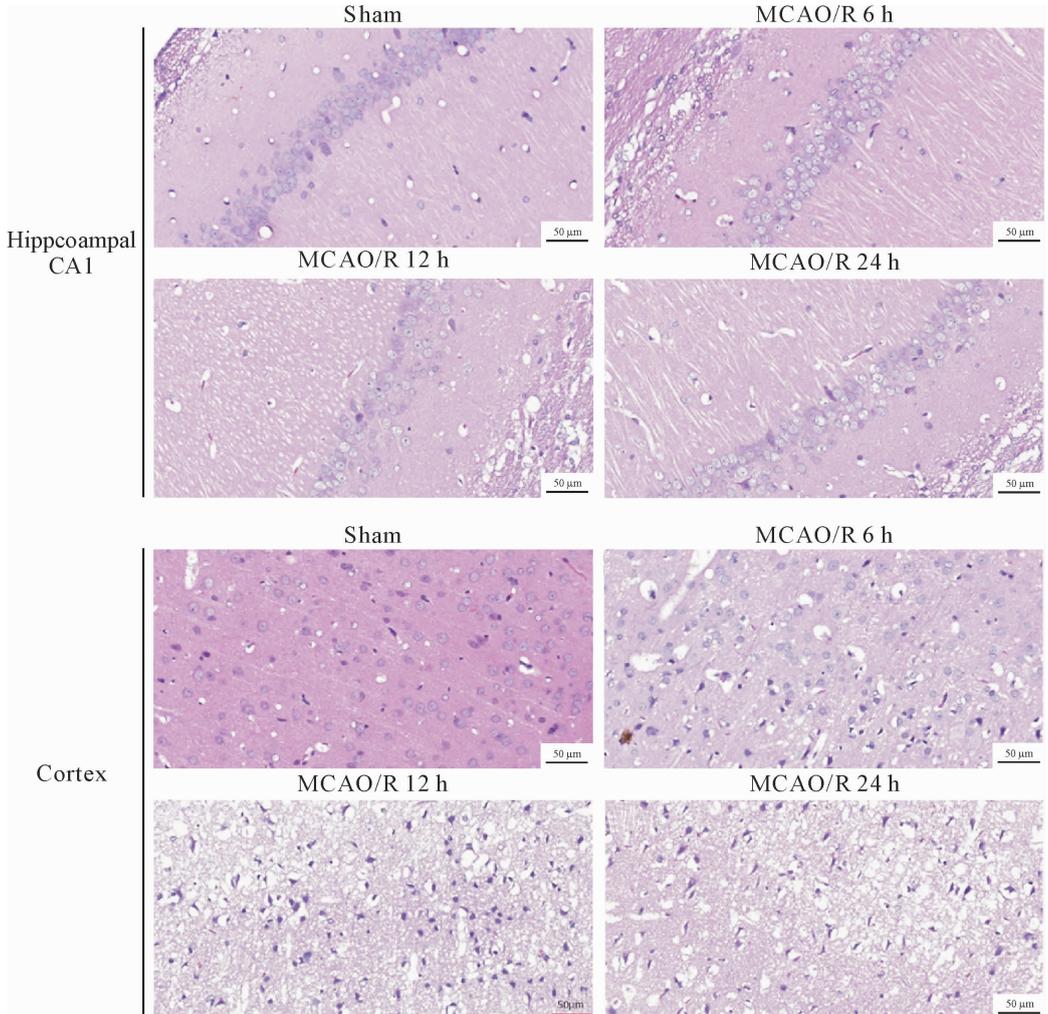


Figure 2. The pathomorphological changes of the hippocampal CA1 and cortical neurons at different time points after cerebral ischemia reperfusion.

图2 脑缺血再灌注后不同时间点海马 CA1 区和皮质区神经细胞的病理形态学变化

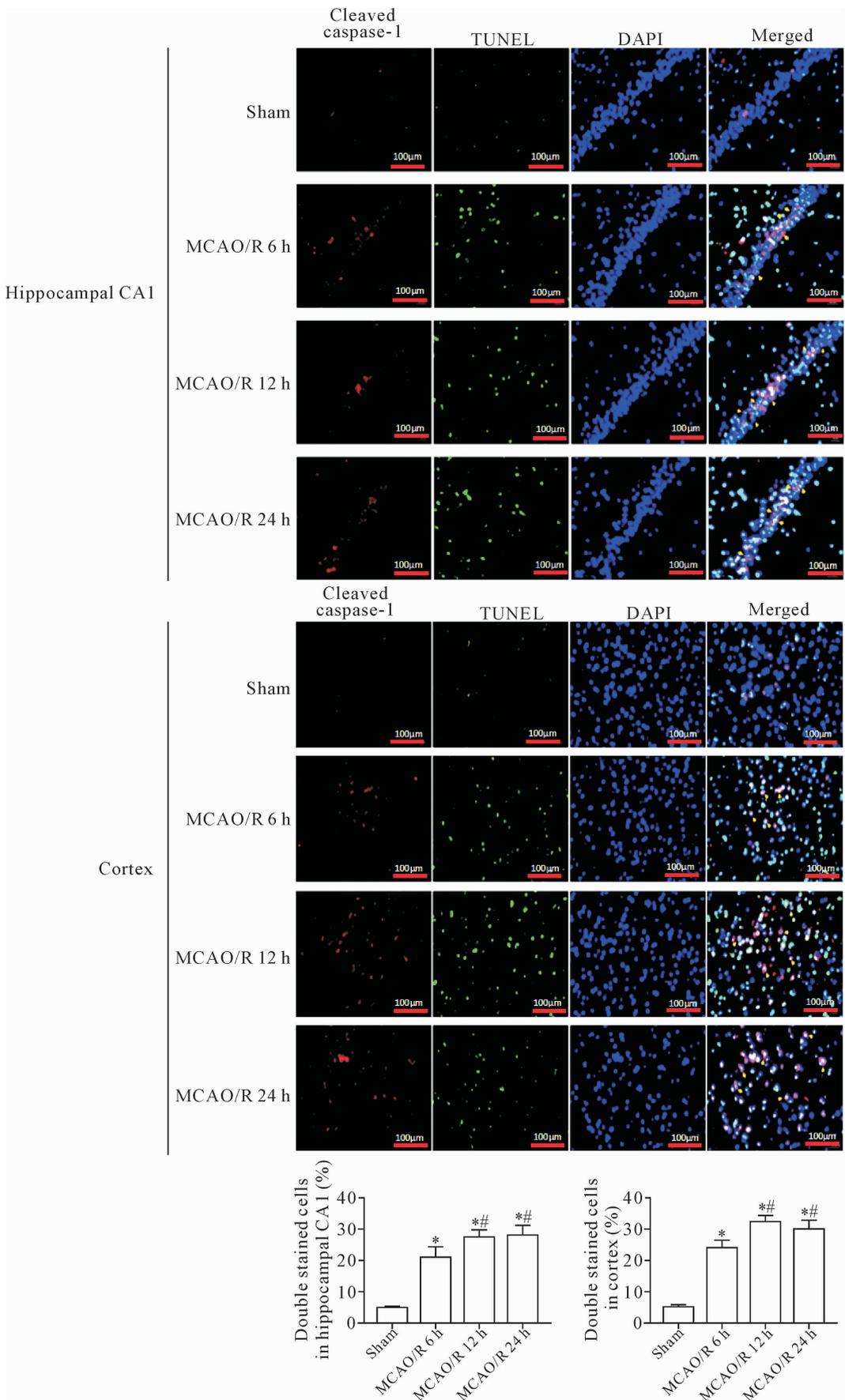


Figure 3. The pyroptosis of the hippocampal CA1 and cortical neurons at different time points after cerebral ischemia reperfusion.

Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs sham group; #  $P < 0.05$  vs MCAO/R 6 h group.

图3 脑缺血再灌注后不同时间点海马 CA1 区和皮质区神经细胞焦亡的比较

#### 4 脑缺血再灌注后不同时间海马和皮质区 NLRP3、pro-caspase-1、cleaved caspase-1 及 IL-1 $\beta$ 蛋白表达的变化

脑缺血再灌注后,脑组织 NLRP3 蛋白表达显著高于假手术组。在海马区,随着再灌注时间的延长,NLRP3 蛋白表达不断增加,MCAO/R 24 h 组的表达

水平最高,MCAO/R 12 h 组和 MCAO/R 24 h 组的 NLRP3 蛋白表达显著高于 MCAO/R 6 h 组 ( $P < 0.05$ );在皮质区,模型组各时点的 NLRP3 蛋白表达显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ),以 MCAO/R 6 h 组的表达水平最高,随后 NLRP3 蛋白表达缓慢下降,见图 4。

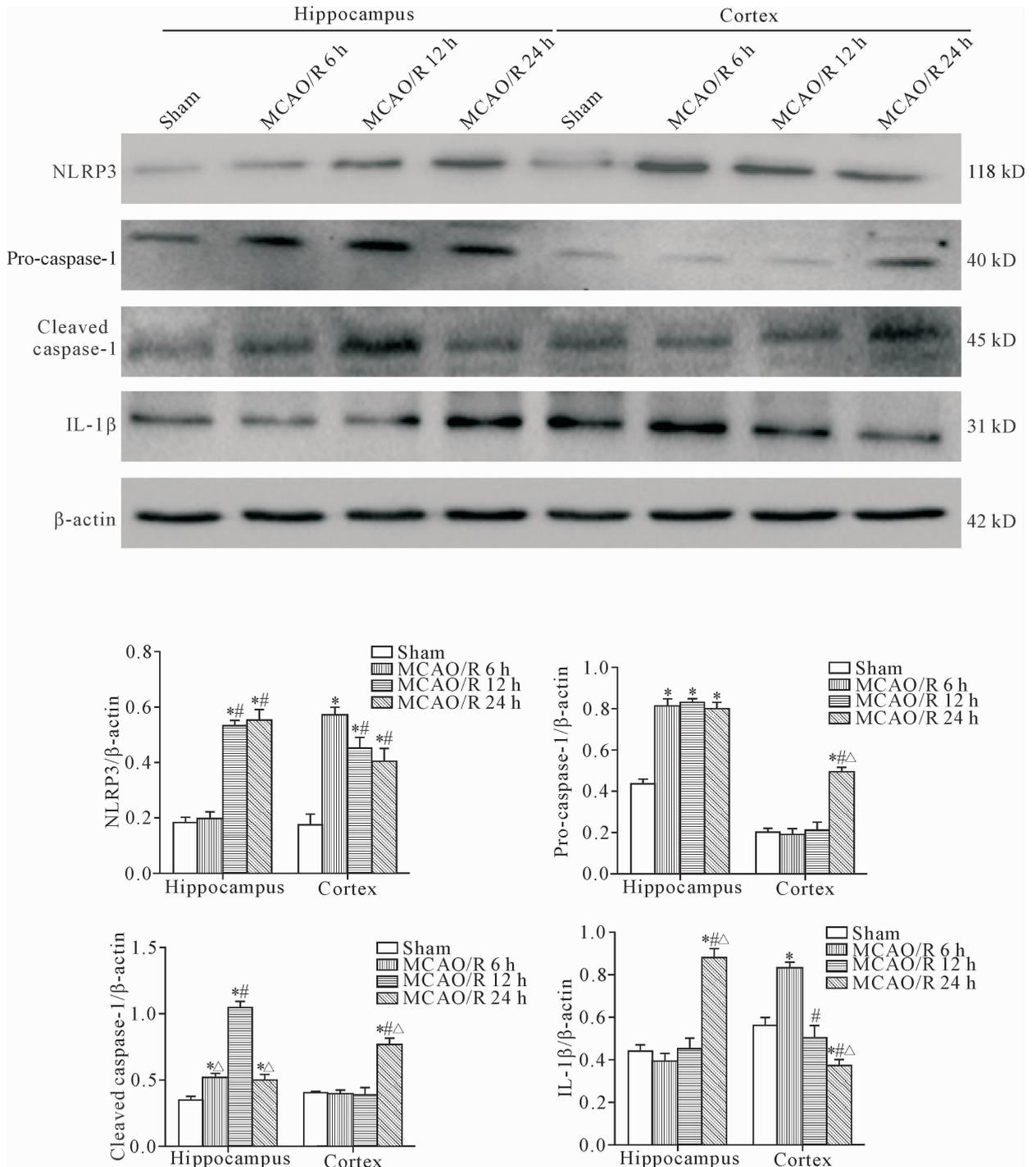


Figure 4. The protein expression of NLRP3, pro-caspase-1, cleaved caspase-1 and IL-1 $\beta$  in the hippocampus CA1 and cortical areas at different time points after cerebral ischemia reperfusion. Mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs sham group; #  $P < 0.05$  vs MCAO/R 6 h group;  $\Delta P < 0.05$  vs MCAO/R 12 h group.

图 4 脑缺血再灌注后不同时间海马 CA1 区和皮质区 NLRP3、pro-caspase-1、cleaved caspase-1 及 IL-1 $\beta$  蛋白表达的比较

脑缺血再灌注后,脑组织 pro-caspase-1 的蛋白表达显著增加。在海马区,模型组各时点的 pro-caspase-1 蛋白表达显著高于假手术组( $P < 0.05$ )。在皮质区,MCAO/R 6 h 组和 12 h 组的 pro-caspase-1 蛋白表达无显著增加( $P > 0.05$ ),而 MCAO/R 24 h 组的 pro-caspase-1 蛋白表达显著增高( $P < 0.05$ ),见图 4。

脑缺血再灌注后,脑组织的 cleaved caspase-1 蛋白表达显著增加。在海马区,模型组各时点 cleaved caspase-1 蛋白的表达增高( $P < 0.05$ ),以 MCAO/R 12 h 组的增高最显著( $P < 0.05$ )。在皮质区,在皮质区,MCAO/R 6 h 组和 MCAO/R 12 h 组的 cleaved caspase-1 蛋白表达无明显增高( $P > 0.05$ ),而 MCAO/R 24 h 组的 cleaved caspase-1 蛋白表达明显增高( $P < 0.05$ ),见图 4。

脑缺血再灌注后,脑组织 IL-1 $\beta$  蛋白表达显著增加。在海马区,MCAO/R 6 h 组和 12 h 组的 IL-1 $\beta$  蛋白表达无显著变化,而 MCAO/R 24 h 组的 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著增高( $P < 0.05$ )。在皮质区,MCAO/R 6 h 组的 IL-1 $\beta$  蛋白表达增高( $P < 0.05$ ),随着再灌注时间延长,IL-1 $\beta$  蛋白表达逐渐下降,见图 4。

## 讨 论

细胞焦亡是一种典型依赖于炎症的程序性细胞死亡方式,其经典焦亡途径依赖于 caspase-1 介导。当机体遭受有害刺激时,胞浆内炎症体的形成,使无活性的 pro-caspase-1 裂解形成有活性的 cleaved caspase-1,cleaved caspase-1 可以诱导细胞膜穿孔使细胞溶解、死亡,胞内物质外释引起炎症反应;同时促进白介素-1 $\beta$  和白介素-18 等促炎症细胞因子的成熟分泌,导致细胞焦亡发生<sup>[9-10]</sup>。

研究表明,细胞焦亡现象广泛存在于炎症类疾病的发生发展中<sup>[11-13]</sup>,其中 caspase-1 介导的经典焦亡途径在帕金森症、阿尔兹海默症、亨廷顿舞蹈症及神经炎伴退行性神经功能缺损等神经系统疾病的发生发展中发挥重要的作用<sup>[14-16]</sup>。Caspase-1 的表达在缺血后神经元、星形胶质细胞以及小胶质细胞显著增加,阻断 caspase-1 的表达能减轻脑缺血后神经损伤<sup>[17]</sup>。Caspase-1 的激活由一系列能形成炎症小体的模式识别受体触发,NLRP3 作为固有免疫重要的模式识别受体参与了缺血后的炎症损伤,NLRP3 炎症小体既能识别各类外源性病原体,又能感知自身内源性危险信号(如缺血再灌注损伤),衔接天然免

疫与获得性免疫反应,是炎症级联反应的关键分子通路。Fann 等<sup>[7]</sup>通过体内外研究均发现脑缺血缺氧后 NLRP3、ASC 及 caspase-1 等蛋白表达增加,NLRP3 炎症小体激活,IL-1 $\beta$  和 IL-18 分泌增多,而 caspase-1 抑制剂可抑制神经元死亡,减轻缺血再灌注损伤。这些研究均证实经典细胞焦亡的相关调控因子参与了缺血性脑损伤,细胞焦亡可能是脑卒中干预的潜在靶点。然而,目前研究仍存在许多问题,如细胞焦亡的检测方法、细胞焦亡在脑缺血再灌注损伤过程中动态演变及分布特点仍需进一步明确。

脑组织中大脑皮质及海马区是对缺血缺氧损害敏感的区域。本文研究了脑缺血再灌注后不同时间细胞焦亡在海马及皮质区的变化特点,并从 NLRP3 介导的经典焦亡途径探究其机制。细胞焦亡在形态学上同时具有坏死和凋亡的特征。与细胞凋亡相似的是,发生焦亡的细胞同样会出现细胞核浓缩、染色质 DNA 断裂以及 TUNEL 染色阳性。细胞焦亡与细胞凋亡均属于细胞程序性死亡方式,但是焦亡并不由传统的凋亡分子 caspase-3 介导,而是由 caspase-1 介导。因此,本研究采用 cleaved caspase-1 和 TUNEL 免疫荧光双染检测细胞焦亡,同一细胞 cleaved caspase-1 染色和 TUNEL 染色双阳性可判断为细胞焦亡。焦亡检测结果表明:脑缺血再灌注后海马及皮质区均出现细胞焦亡现象,尤以 MCAO/R 12 h 和 24 h 最明显。这一作用与神经损伤的变化基本一致,证实了细胞焦亡参与了脑缺血再灌注后神经细胞损伤。NLRP3 介导的经典焦亡途径相关蛋白检测结果表明,NLRP3 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达在海马区和皮质区的变化趋势不同,随着再灌注时间延长,NLRP3 和 IL-1 $\beta$  蛋白表达在海马区逐渐上升,而在皮质区表达先升高再逐渐下降,推测经典焦亡途径激活部位的皮质区先于海马区。Pro-caspase-1 和 cleaved caspase-1 蛋白表达在海马区 3 个时点均升高,以 MCAO/R 12 h 表达显著,而皮质区只在 MCAO/R 24 h 表达显著,说明脑缺血再灌注损伤后 NLRP3/caspase-1 焦亡轴激活部位主要在海马区。本研究证实细胞焦亡参与了缺血性神经损伤,经典焦亡途径在海马和皮质区均发挥重要调控作用,皮质区对 NLRP3/caspase-1 焦亡轴的激活最敏感,而海马区对 NLRP3/caspase-1 焦亡轴的激活持续时间比皮质区长。提示海马区是脑缺血后神经细胞焦亡和炎症反应诱发的继发性神经损伤的主要部位,但以何种途径激活经典细胞焦亡参与脑缺血再灌注神经损伤仍需进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2):99-109.
- [2] Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intra-cellular pathogens[J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1):130-142.
- [3] Doitsh G, Galloway NL, Geng X, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection [J]. *Nature*, 2014, 505(7484):509-514.
- [4] Wellington M, Koselny K, Sutterwala FS, et al. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages[J]. *Eukaryot Cell*, 2014, 13(2):329-340.
- [5] Jin CC, Flavell RA. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Clin Immunol*, 2010, 30(5):628-631.
- [6] Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2014, 15(2):84-97.
- [7] Fann DY, Lee SY, Manzanero S, et al. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e790.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [9] Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1 induced pyroptotic cell death[J]. *Immunol Rev*, 2011, 243(1):206-214.
- [10] Kayagaki N, Wong M, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4[J]. *Science*, 2013, 341(6151):1246-1249.
- [11] 徐洁, 杨羚, 张萌, 等. 西格列汀对2型糖尿病大鼠心肌细胞焦亡的影响及其可能机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6):969-974.
- [12] Winter SE, Winter MG, Atluri V, et al. The flagellar regulator TviA reduces pyroptosis by *Salmonella enterica* serovar Typhi [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4):1546-1555.
- [13] Accarias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, et al. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice[J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(3):794-806.
- [14] Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698(1-3):6-18.
- [15] Tricarico PM, Marcuzzi A, Piscianz E, et al. Mevalonate kinase deficiency and neuroinflammation: balance between apoptosis and pyroptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12):23274-23288.
- [16] Chien H, Dix RD. Evidence for multiple cell death pathways during development of experimental cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression: apoptosis, necroptosis, and pyroptosis[J]. *J Virol*, 2012, 86(20):10961-10978.
- [17] Rabuffetti M, Sciorati C, Tarozzo G, et al. Inhibition of caspase-1-like activity by Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-chloromethyl ketone induces long-lasting neuroprotection in cerebral ischemia through apoptosis reduction and decrease of proinflammatory cytokines[J]. *Neurosci*, 2000, 20(12):4398-4404.

(责任编辑: 林白霜, 余小慧)