

· 基础研究 ·

Caspase-1 介导的焦亡在脓毒症小鼠神经元损伤中的作用研究

尹磊¹, 傅群², 石金云², 吴晶², 吴敬医^{1*}

¹皖南医学院第一附属医院麻醉科, 安徽 芜湖 241001; ²南京中医药大学附属中西医结合医院麻醉科, 江苏 南京 210000

[摘要] 目的: 观察半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 介导的焦亡在脓毒症小鼠神经元损伤中的作用。方法: 盲肠结扎穿孔法 (cecal ligation and puncture, CLP) 建立小鼠脓毒症模型。成年雄性 C57BL/6 小鼠 90 只随机分为 4 组: 假手术+生理盐水组 (Sham 组, 15 只)、假手术+Caspase-1 特异性抑制剂 Ac-YVAD-CMK 组 (Sham+CMK 组, 15 只)、脓毒症+生理盐水组 (CLP 组, 30 只) 和脓毒症+Ac-YVAD-CMK 组 (CLP+CMK 组, 30 只), 术后第 7 天各组取 6 只小鼠分离脑组织, 检测海马 CA1 区神经元损伤情况和 Caspase-1 阳性细胞数, 以及海马组织 Caspase-1、焦亡标记物 Gasdermin-D 蛋白 (GSDMD)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-18 水平; 余下小鼠术后第 14 天行条件恐惧性实验检测认知功能。结果: 与 Sham 组相比, CLP 组小鼠海马 CA1 区神经元明显损伤, Caspase-1 阳性细胞数增多, 海马组织中 Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及 IL-18 含量明显升高 ($P < 0.05$), 表现为海马依赖的认知功能损伤。与 CLP 组相比, CLP+CMK 组小鼠 CA1 区神经元无明显损伤, Caspase-1 阳性细胞数减少, Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及 IL-18 含量降低, 认知功能明显改善 ($P < 0.05$)。结论: 脓毒症可引起小鼠海马神经元损伤及 Caspase-1 介导的焦亡的激活, 抑制 Caspase-1 介导的焦亡具有神经元保护和认知保护作用。

[关键词] 脓毒症; 焦亡; 半胱氨酸蛋白酶-1; 炎症因子

[中图分类号] R338.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1567-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20191103

Effects of Caspase-1-mediated pyroptosis on neuronal injury in sepsis mice

Yin Lei¹, Fu Qun², Shi Jinyun², Wu Jing², Wu Jingyi^{1*}

¹Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Wannan Medical Collage, Wuhu 241001; ²Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese, Nanjing 210000, China

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Caspase-1-mediated pyroptosis on neuronal injury in sepsis mice. **Methods:** Mouse model of sepsis was established by cecal ligation and puncture (CLP) surgery. Ninety adult male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: Sham+saline group ($n=15$, Sham group), Sham + Caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CMK group (N-acetyl-tyrosyl-valyl-alanyl-aspartyl chloromethyl ketone, $n=15$, Sham+CMK group), CLP + saline group ($n=30$, CLP group) and CLP+Ac-YVAD-CMK group ($n=30$, CLP+CMK group). Seven days after surgery, the brain of each mouse ($n=6$ /each group) was rapidly harvested for determining the score of neuronal injury, number of Caspase-1-immunoreactive cells, contents of cleaved Caspase-1, pyroptosis biomarker Gasdermin-D (GSDMD), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18. Fourteen days after surgery, fear conditioning test was performed to evaluate the cognitive function for the rest of the mice. **Results:** Compared with the Sham group, the score of neuronal damage, number of Caspase-1-immunoreactive cells, contents of cleaved Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 were significantly increased in the CLP group ($P < 0.05$), and mice of CLP group exhibited significant hippocampus-dependent cognitive impairment. Compared with the CLP group, increase of Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 were inhibited by Ac-YVAD-CMK administration in the CLP+CMK group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sepsis induces neuronal injury and activation of Caspase-1-mediated pyroptosis in mice hippocampus, and inhibiting Caspase-1 with Ac-YVAD-CMK ameliorates sepsis-induced pyroptosis, neuronal injury and cognitive impairment.

[Key words] sepsis; pyroptosis; Caspase-1; inflammatory cytokines

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11): 1567-1570, 1691]

[基金项目] 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2016A730)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yjsicu@163.com

脓毒症是常见的临床急危重症,具有较高的致死率^[1-2]。细胞焦亡(pyroptosis)是一种由 Gasdermin 蛋白介导的程序性细胞死亡,分为依赖半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的经典细胞焦亡途径和依赖 Caspase-4/5/11 的非经典细胞焦亡途径^[3-4]。近年来有研究提出焦亡的过度激活可能是脓毒症及脓毒性休克的发病机制之一,然而确切机制尚不清楚^[3,5],且关于焦亡在脓毒症小鼠神经元损伤中的作用鲜有报道。本研究采用盲肠结扎穿孔法(cecal ligation and puncture, CLP)建立小鼠脓毒症模型^[6],通过应用 Caspase-1 特异性抑制剂 Ac-YVAD-CMK,观察 Caspase-1 介导的经典焦亡途径在脓毒症小鼠神经元损伤中的作用,探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

成年雄性 C57BL/6 小鼠 90 只,体重 28~32 g(常州卡文斯实验动物有限公司),随机分为 4 组:假手术+生理盐水组(Sham 组,15 只)、假手术+ Ac-YVAD-CMK 组(Sham+CMK 组,15 只)、脓毒症+生理盐水组(CLP 组,30 只)和脓毒症+Ac-YVAD-CMK 组(CLP+CMK 组,30 只)。依据分组于术前 30 min 及术后 1、2、4、6 d 腹腔注射生理盐水(10 mL/kg)或 Ac-YVAD-CMK(100 μ g/只, Cayman Chemical Company 公司,美国)^[7]。本动物实验符合 3R 原则。

1.2 方法

1.2.1 脓毒症模型建立

术前小鼠禁食 12 h, 2%戊巴比妥钠(40 mg/kg, Sigma 公司, 美国)腹腔注射麻醉。CLP 组和 CLP+CMK 组小鼠沿腹正中线行 1 cm 长的切口,游离肠系膜和盲肠远端,并以 5-0 丝线环形结扎盲肠根部,22 号针头于结扎端贯通穿刺 2 次,挤出粪便少许,还纳肠段并依次缝合腹膜和皮肤。Sham 组和 Sham+CMK 组仅行剖腹、游离盲肠、关腹手术。术后立即皮下注射生理盐水 30 mL/kg,补充术中液体丢失。

1.2.2 HE 染色

术后第 7 天每组取 6 只小鼠,取出两侧大脑组织,一侧用 4%多聚甲醛固定并石蜡包埋切片。HE 染色严格按照试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)说明进行操作。显微镜下观察神经元细胞损伤情况,细胞核染色呈蓝色,细胞质染色呈红色。神经元损伤情况采用神经元损伤指数进行分析^[8]。0 级:海马 CA1 区无损伤;1 级:轻度神经元损伤(CA1 区散在损伤的神经元);2 级:中度神经元损伤(CA1 区

损伤的神经元<50%);3 级:重度神经元损伤(CA1 区损伤的神经元 \geq 50%)。

1.2.3 免疫组织化学检测 Caspase-1 阳性细胞数

标本切片后用二甲苯浸泡 2 次,各 10 min。在不同浓度(100%、95%、85%、70%)乙醇中分别浸泡 5 min 进行水化。清洗 3 次后在抗原修复缓冲液中进行抗原修复。3% H₂O₂-甲醇溶液处理切片 15 min 灭活酶。Caspase-1 免疫染色严格按照试剂操作说明进行操作。染色结果中神经元细胞被染成黄褐色或棕黄色即为 Caspase-1 阳性细胞。

1.2.4 Western blot 检测 Caspase-1 和 GSDMD 含量

取另一侧大脑提取新鲜海马组织,磷酸缓冲液清洗后,加入裂解缓冲液匀浆裂解组织,用于 Western blot 和 ELISA 检测。取部分组织离心取上样,加热 5 min 使蛋白变性,凝胶电泳分离,转膜,含 5%脱脂奶粉溶液的封闭液中封闭 1 h。加入封闭液和适量一抗室温孵育 2 h,洗涤后加入二抗室温孵育 1 h,脱色、底物显色反应、显影。采用 Image J 软件检测 Cleaved Caspase-1(武汉赛维尔生物科技有限公司)和焦亡标记物 Gasdermin-D 蛋白(GSDMD, Biorbyt 公司,英国)的含量。 β -actin 抗体购于美国 Bioworld 公司。

1.2.5 ELISA 检测 IL-1 β 及 IL-18 水平

取小鼠海马组织裂解后的上清液,参照小鼠白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 及 IL-18 酶联免疫分析试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)说明书步骤检测炎症因子 IL-1 β 及 IL-18 水平。

1.2.6 条件恐惧性实验

术后第 14 天,余下小鼠行条件恐惧性实验,将小鼠放入 75%酒精擦拭的实验箱(30 cm \times 30 cm \times 45 cm)中适应 180 s 后,接受声音和足底电击刺激(声音:30 s、65 dB、3 000 Hz;电击:3 s、0.75 mA),继续停留 30 s 后放回原饲养笼。训练结束 24 h 后进行场景和声音实验。场景实验将小鼠放入相同环境中 390 s,记录第 2 个 300 s 内僵直时间。声音实验将小鼠放入不同环境中 390 s,第 2 个 180 s 时给予相同声音刺激而无电击,记录僵直时间。训练和测试阶段由图像自动监视系统(XR-XC404,上海欣软信息科技有限公司)追踪小鼠僵直反应时间。每次实验结束后用 75%酒精擦拭场地,避免前只小鼠残留气味影响实验结果。

1.3 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 软件进行统计分析。组间比较采用单因素

方差分析,两两比较采用SNK法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

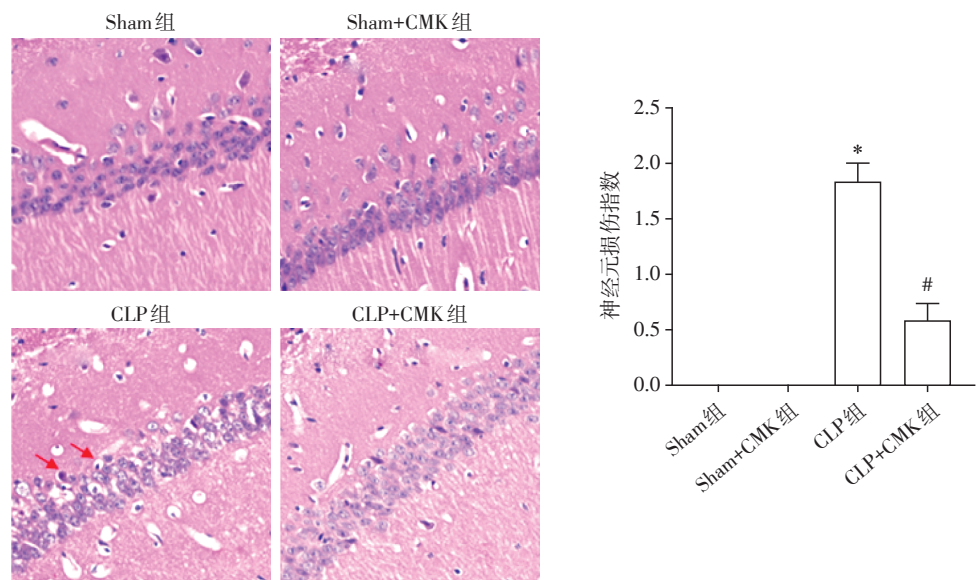
2 结果

2.1 海马神经元损伤情况

与Sham组比较,CLP组小鼠海马神经元明显损伤,神经元胞体呈皱缩或空泡状,细胞核固缩深染,损伤指数增加;与CLP组比较,CLP+CMK组小鼠海马神经元形态趋于正常,神经元损伤指数减少($P <$

0.05,图1)。
2.2 Caspase-1 阳性细胞数
与Sham组相比,CLP组小鼠海马CA1区 Caspase-1 阳性细胞数明显增多($P < 0.05$);与CLP组相比,CL+CMK组小鼠Caspase-1 阳性细胞数明显减少($P < 0.05$,图2)。

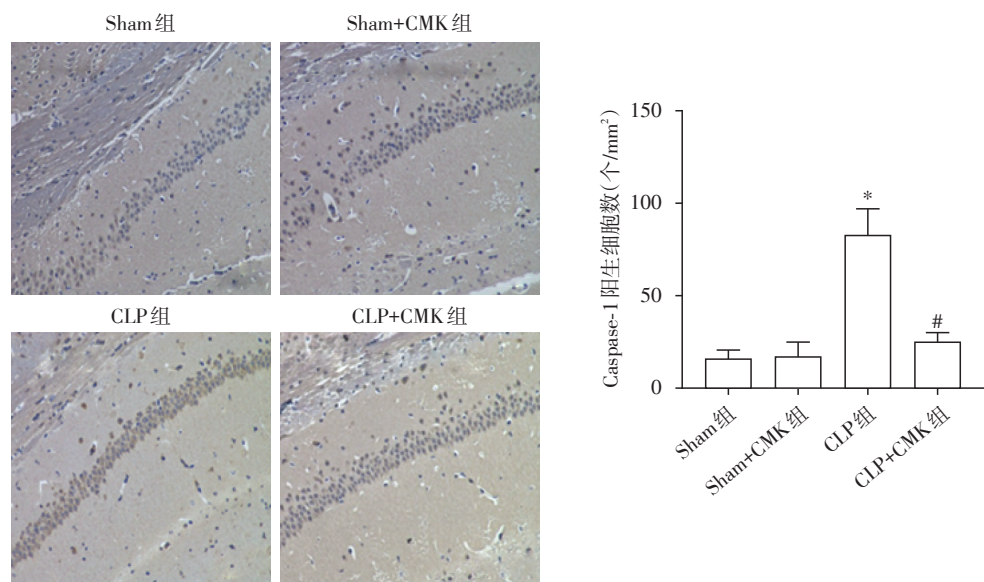
2.3 Cleaved Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及IL-18含量
与Sham组相比,CLP组海马组织中 Cleaved Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及IL-18含量明显增高;与



箭头方向为损伤的神经元。与Sham组比较,* $P < 0.05$;与CLP组比较,* $P < 0.05$ 。

图1 各组小鼠海马神经元HE染色结果及神经元损伤指数比较(×400)

Figure 1 HE staining result for hippocampal neurons and comparison on score of neuronal injury among 4 groups(×400)



与Sham组比较,* $P < 0.05$;与CLP组比较,* $P < 0.05$ 。

图2 各组小鼠Caspase-1阳性细胞数比较(免疫组化,×200)

Figure 2 Comparison on number of Caspase-1 positive cells among 4 groups(IHC,×200)

CLP组相比,CL+CMK组小鼠Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及IL-18含量明显降低($P < 0.05$,图3)。

2.4 行为学实验结果

与Sham组比较,CLP组小鼠情景实验僵直时间

明显缩短($P < 0.05$),表现为海马依赖的学习记忆损伤;与CLP组相比,CLP+CMK组小鼠情景实验僵直时间明显延长($P < 0.05$);4组之间声音实验差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

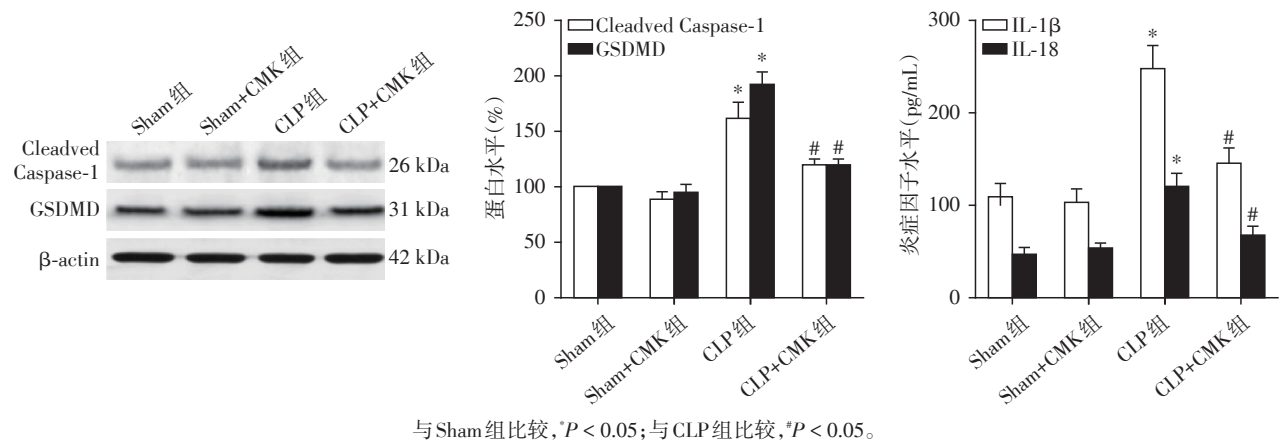


图3 各组小鼠 Cleaved Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及 IL-18 含量比较
Figure 3 Comparison of Cleaved Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 levels among 4 groups

表1 条件性恐惧实验结果				
Table 1 Results of fear conditioning test				
	(% , $\bar{x} \pm s$)			
实验方法	Sham组	Sham+CMK组	CLP组	CLP+CMK组
场景实验	47.8 \pm 12.8	47.1 \pm 15.7	28.1 \pm 9.8*	44.7 \pm 12.3#
声音实验	43.7 \pm 14.4	43.0 \pm 12.1	39.0 \pm 11.4	40.2 \pm 10.7

与Sham组比较,* $P < 0.05$;与CLP组比较,# $P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞焦亡是一种由炎症小体介导的、伴有大量促炎症细胞因子释放的、新型程序性细胞死亡方式^[3-4]。近年来研究表明,炎性Caspase的底物GSDMD蛋白是介导细胞焦亡的关键“杀手蛋白”。Caspase可特异性裂解GSDMD蛋白,产生GSDMD-N结构域与GSDMD-C结构域,最终通过形成蛋白孔洞而导致细胞焦亡^[9-10]。研究发现,在炎症性疾病及神经退行性疾病发病过程中,GSDMD蛋白表达明显增高,表明细胞焦亡的过度激活^[11-12]。本研究亦观察到脓毒症小鼠海马组织中GSDMD蛋白表达增高,说明神经元焦亡增加;并且海马神经元明显损伤甚至死亡,脓毒症小鼠表现为海马依赖的认知功能障碍。本研究结果表明,脓毒症时神经元损伤可能与焦亡激活有关。

Caspase-1依赖的GSDMD蛋白的激活是焦亡的经典途径^[13-15]。Caspase-1激活GSDMD蛋白后,可以引起细胞膜破裂,并进一步引起大量炎症因子如IL-1 β 和IL-18的释放,引起细胞焦亡^[13-15]。本研究观察到伴随GSDMD蛋白表达增高,活化的Caspase-1

及炎症因子IL-1 β 和IL-18含量明显升高;给予Caspase-1特异性抑制剂Ac-YVAD-CMK后,Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 及IL-18含量均明显降低,表明脓毒症时焦亡的激活与Caspase-1活化有关,抑制Caspase-1的活化可以明显抑制Caspase-1依赖的经典焦亡途径,并进一步抑制神经元损伤和认知障碍。

综上所述,脓毒症可引起小鼠海马神经元Caspase-1介导的焦亡的激活,给予Caspase-1特异性抑制剂Ac-YVAD-CMK可抑制这一途径的激活,并改善脓毒症所致海马神经元的损伤。

【参考文献】

[1] Winters BD, Eberlein M, Leung J, et al. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review [J]. Crit Care Med, 2010, 38(5): 1276-1283

[2] 曹 兴, 廖雪莲, 贺小丽, 等. 老年脓毒症患者远期病死率及生活质量的预测因素分析[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, 49(1): 140-144

[3] Aglietti RA, Dueber EC. Recent insights into the molecular mechanisms underlying pyroptosis and gasdermin fami-

(下转第1691页)

- et,2017,28:52-70
- [7] Qian X,Hou J,Wang Z,et al. Next generation sequencing plus (NGS+) with Y-chromosomal markers for forensic pedigree searches[J]. *Sci Rep*,2017,7(1):11324
- [8] Buchard A,Kampmann ML,Poulsen L,et al. ISO 17025 validation of a next-generation sequencing assay for relationship testing [J]. *Electrophoresis*, 2016, 37 (21) : 2822-2831
- [9] Eduardoff M,Santos C,de la Puente M,et al. Inter-laboratory evaluation of SNP-based forensic identification by massively parallel sequencing using the Ion PGM[J]. *Forensic Sci Int Genet*,2015,17:110-121
- [10] Zhang S,Bian Y,Chen A,et al. Developmental validation of a custom panel including 273 SNPs for forensic application using Ion Torrent PGM.[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2017,27:50-57
- [11] Eduardoff M, Gross TE, Santos C, et al. Inter-laboratory evaluation of the EUROFORGEN Global ancestry-informative SNP panel by massively parallel sequencing using the Ion PGM[J]. *Forensic Sci Int Genet*,2016,23:178-189
- [12] Grandell I,Samara R,Tillmar AO. A SNP panel for identity and kinship testing using massive parallel sequencing [J]. *Int J Legal Med*,2016,130(4):905-914
- [13] Ralf A, van Oven M,Zhong K,et al. Simultaneous analysis of hundreds of Y-chromosomal SNPs for high-resolution paternal lineage classification using targeted semiconductor sequencing[J]. *Hum Mutat*, 2015, 36 (1) : 151-159
- [收稿日期] 2018-03-29

(上接第1570页)

- ly functions[J]. *Trends Immunol*,2017,38(4):261-271
- [4] Shi J,Gao W,Shao F. Pyroptosis:gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017,42(4):245-254
- [5] Gao YL,Zhai JH,Chai YF. Recent advances in the molecular mechanisms underlying pyroptosis in sepsis[J]. *Mediators Inflamm*,2018,2018:5823823
- [6] Wu J,Zhang M,Hao S,et al. Mitochondria-targeted peptide reverses mitochondrial dysfunction and cognitive deficits in sepsis-associated encephalopathy[J]. *Mol Neurobiol*,2015,52(1):783-791
- [7] Chen YL,Xu G,Liang X,et al. Inhibition of hepatic cells pyroptosis attenuates CLP-induced acute liver injury [J]. *Am J Transl Res*,2016,8(12):5685-5695
- [8] Tang Y,Liu X,Zhao J,et al. Hypothermia-induced ischemic tolerance is associated with Drp1 inhibition in cerebral ischemia-reperfusion injury of mice [J]. *Brain Res*, 2016,1646(1):73-83
- [9] Sborgi L,Ruhl S,Mulvihill E,et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death[J]. *EMBO J*,2016,35(16):1766-1778
- [10] Gaidt MM,Hornung V. Pore formation by GSDMD is the effector mechanism of pyroptosis [J]. *EMBO J*, 2016, 35 (20):2167-2169
- [11] Tan MS,Tan L,Jiang T,et al. Amyloid-beta induces NL-*RP1*-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease[J]. *Cell Death Dis*,2014,5(8):e1382
- [12] 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 USA*,2018,115(26):E6065-E74
- [13] Shi J,Zhao Y,Wang K,et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*,2015,526(7575):660-665
- [14] Ding J,Wang K,Liu W,et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*,2016,535(7610):111-116
- [15] Wallach D,Kang TB,Dillon CP,et al. Programmed necrosis in inflammation: toward identification of the effector molecules[J]. *Science*,2016,352(6281):aaf2154
- [收稿日期] 2018-09-27