

· 综述 ·

二代测序技术分析SNP在法医学上的应用

余 韬, 吕飒丽, 李 岩*

南京医科大学生物信息学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是指在基因组水平上由单个核苷酸变异所引起的脱氧核糖核酸序列多态性。SNP多为双等位型标记,具有分布密度高,突变率低,位置不均匀等特点。在法医领域,SNP广泛应用于身份鉴定、系谱推断、始祖推断和表型推断等场景。但目前第一代测序技术对SNP的分析效率尚不理想。而随着第二代测序技术的逐步发展,SNP的处理效率可以得到极大提升。因此,利用二代测序技术分析SNP在法医学应用上有着巨大潜力和广阔前景。

[关键词] 单核苷酸多态性;二代测序;法医学

[中图分类号] Q524.3;DF795.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1686-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20191133

The application of next generation sequencing in SNP analysing in forensic medicine

Yu Tao, Lü Sali, Li Yan*

Department of Bioinformatics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] Single nucleotide polymorphism (SNP) refers to the DNA polymorphism caused by the variation of the single nucleotide in the level of genotype. SNP, as a kind of biallelic marker, is characterised by the high density, low mutation rate and uneven distribution. In the field of forensic medicine, SNP is applied for the inference of identity, lineage, ancestry and phenotype. However, the current first generation sequencing cannot analyze SNP effectively. Owing to the development of next generation sequencing (NGS), SNP processing speed improved greatly. Therefore, the application of NGS to analyze SNP has great potential and broad prospects in the forensic medicine.

[Key words] single nucleotide polymorphism; next generation sequencing; forensic medicine

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11): 1686-1691]

在人DNA中起配对作用的碱基包括腺嘌呤(adenine, A)、鸟嘌呤(guanine, G)、胸腺嘧啶(thymine, T)和胞嘧啶(cytosine, C)4种。如果超过1%的人口在相同基因位点上有1个不同的核苷酸,那么这种单个核苷酸变异引起的基因多态性就被称为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。SNP与人体的病原易感性、疾病发展和药物耐受等生物学过程密切相关,具有丰富的诊疗价值,如早老综合征患者的LMNA基因上CGT突变成

CTT,就是一种典型致病SNP。

在法医学领域,通过分析与不同表型相关联的SNP,研究人员即可获得嫌疑人种族、瞳色、发色和肤色等重要信息。而且,与短串联重复序列多态性(short tandem repeat, STR)相比,SNP具有遗传更稳定、等位基因更少和扩增产物长度更短等特点。因此,使用SNP有望从更少的法医学样本中挖掘出更丰富的信息。但因为单个SNP仅有2个等位基因,信息量有限,需同时检测高通量SNP才能使鉴别能力显著提高。以双脱氧链末端终止法(sanger sequencing, Sanger法)为标志的第一代测序技术测序效率低、成本高,难以满足这一要求。目前,以焦磷酸测序、合成测序及芯片测序三大技术为代表的第

[基金项目] 江苏省大学生创新创业训练项目基金资助(201510312047Y)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liyan@njmu.edu.cn

二代测序技术(next generation sequencing, NGS)正逐步发展^[1]。NGS能够在保证测序精度的前提下增加通量,获得高基因组覆盖的数据,最大程度挖掘出SNP背后的遗传学信息。因此,本文通过对法医学领域NGS分析SNP的基础理论和实际成果进行综述,力图展示NGS分析SNP这一策略在法医学上的广阔应用前景。

1 SNP的基本特性

群体中正常个体基因组某些位点上的核苷酸存在差别,如同复等位基因那样可以有2种以上不同的核苷酸。当次要等位型在群体中的频率大于1%时即界定为SNP,低于1%则归于突变的范畴。这种单个核苷酸位点存在多态的现象即为SNP,具有以下几种基本特性。

1.1 分布密度高

SNP是人类可遗传变异中最常见的一种,占人类基因多态性90%以上,平均每100~300个碱基对中就有1个。目前发现每个人类基因组中约有350万SNPs, HapMap二期计划共发现了超过1 000万种人类基因组的SNPs。随着测序技术的不断发展,新的SNP也在不断被发现。

1.2 标记二态性

SNP所表现的多态性只涉及到单个碱基的变异,不包括碱基的插入和缺失。这种变异共有4种类型,包括1个转换C↔T(G↔A)和3个颠换C↔A(G↔T)、C↔G(G↔C)、A↔T(T↔A)。可能由于5'甲基胞嘧啶的去氨基反应较易发生,转换的发生率总是高于其他几种变异,约占总数的2/3。理论上SNP可有2种、3种及4种的多态类型,但三等位型和四等位型很少,几乎无法检出,所以通常所说的SNP都是二等位多态标记,即在该位置只存在2种不同的碱基。仅从这一点上看,SNP在单个位点上的多态性比其他分子标记低。不过由于分布密度高的性质,SNP的总体标识能力很强。

1.3 位置不均匀

根据在基因中的位置,SNP可分为基因编码区SNP(coding-region SNP, cSNP)、基因周边SNP以及基因间SNP三类。因为编码区内的变异率仅为周围序列的1/5,所以cSNP的总量显著地少于其他类型SNP,只有约4.3%的SNP位于外显子内。但cSNP与蛋白质功能有关,因此在遗传性疾病研究中更受关注。cSNP又可分为同义cSNP和非同义cSNP,非同义cSNP往往是生物性状改变的直接原因。

1.4 突变率低

SNP是基于单核苷酸的突变,突变率仅为 1×10^{-8} ,远低于突变率为 1×10^{-3} 的STR。因此,SNP被认为是一种能够稳定遗传的早期突变。

综上,SNP为双等位型标记,具有高密度、低突变率、在DNA序列上不均匀分布的特点。因此可用于解决STR技术不能解决的问题,尤其对降解检材DNA的分析和表型DNA的构建具有重要意义^[2]。普遍认为其是继第一代限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和第二代STR之后的第三代分子标记。

2 SNP在法医领域应用现状

由美国麻省理工人类基因组中心负责人Lander等于1996年提出的用SNP作为新一代法医学检测方法拥有诸多优点。第一,SNP数目更大,覆盖范围更广,能比STR提供更全面的信息。尽管单个SNP信息量低于STR,3~4个SNPs才能形成相当于1个STR标记的多态性。但SNP数量巨大,分布频密,从整体而言,多态性实际上更高。第二,二态座位SNP的检测结果只有阳性和阴性2种,便于自动化分析。第三,SNP突变率低,较STR等标记遗传稳定性更高。第四,SNP序列较短,识别序列可仅需45~55 bp,引物可以设计得距SNP位点很近,更适用于高度腐败降解的法医生物检材。因此,SNP在以下几个方面具有很好的发展前景。

2.1 身份鉴定SNP(identity-informative SNP, iiSNP)

在2个个体之间相同概率极低的SNP被称为iiSNP。iiSNP具有低等位基因频率,高平均杂合度的特征。在法医学中,iiSNP可用于提供基因信息分辨不同个体,以及根据DNA样本排除嫌疑人。目前,已有包含90种iiSNPs的HID-Ion AmpliSeq身份鉴定试剂盒被设计出来用于法医学研究。

2.2 系谱推断SNP(lineage-informative SNP, liSNP)

能作为多等位基因标记高概率确认亲属的紧密联系的SNP被称为liSNP。liSNP可存在于X染色体、Y染色体和线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)中,起到标记基因的作用,常运用于失踪人口案件或重大事故后的身份鉴定。在某些参考样本和证据样本已经分离了很多代的案件中,liSNP仍能凭借其低突变率的特点,估算出一个染色体样本近代共同祖先的“年龄”,为亲权鉴定提供大量信息。

2.3 始祖推断SNP(ancestry-informative SNP, aiSNP)

能高概率确认个体祖先来源地的SNP被称为

aiSNP。aiSNP具有高等位基因频率和中等平均杂合度的特征,其在世界不同人群中的出现频率不同。已有一款包含41个aiSNPs的小型试剂盒被设计出来可以分辨来自7个大陆地区的人群,包括非洲、中东、欧洲、中南亚、东亚、美洲和大洋洲。根据生物地理起源,司法部门能间接推算出部分表型特点。如在2003年美国路易斯安那州连环杀人案的调查中,尽管证人指称罪犯为白人,但通过对证物aiSNP分析发现,犯罪嫌疑人为非裔的可能性为85%,从而间接推测出犯罪嫌疑人为深色皮肤,为调查提供了线索。

2.4 表型推断 SNP (phenotypic - informative SNP, piSNP)

高概率使个体拥有特异表型的SNP被称为piSNP。piSNP可以直接提供有关犯罪嫌疑人外部可见信息(externally visible characteristic, EVC),包括发色、肤色和瞳色等。IrisPlex系统可确认蓝棕色瞳孔的DNA,对3800例欧洲人群体蓝棕色瞳孔辨认的准确性达94%^[3]。而发色(红、金、棕、黑)又与瞳色紧密相关,因此可同时测量发色和瞳色的HIrisPlex系统应运而生^[4]。HIrisPlex系统针对24个瞳色和发色的DNA进行多重检测,其中包括6个IrisPlex SNPs,最少提供63 pg样本即可运行,对DNA < 160 bp的降

解检材有很高的识别度。犯罪现场材料中透露的EVC越多,对确认嫌疑人外貌、识别失踪人口肢体的帮助越大。因此,piSNP是目前研究表型相关基因的最好工具,具有极高的法医学价值。

3 二代测序分析SNP的方法

SNP检验方法较多,包括PCR-RFLP分析、单链构象多态性分析等。但这些方法不仅费时、信息量少,而且易受外部条件的影响。因此能够进行高通量测量、精度更高、成本更低的NGS将更有利于SNP的分析。与现有PCR毛细管电泳(PCR-capillary electrophoresis, PCR-CE)平台相比,运用NGS不仅令DNA测序费用降到了以前的百分之一,而且基于微量生物样本就可以获得大量SNP信息。

近年来NGS主要包括瑞士Roche公司的454基因组测序仪、美国Illumina公司的Solexa测序仪、美国ABI公司的SOLiD测序仪和美国Thermo Fisher公司的Ion Torrent测序仪等。二代测序实验过程大体可分为文库制备、簇生成、测序反应和数据分析4个步骤。本文只详细介绍Solexa系统的测序流程,各二代测序平台特点见表1。

2006年,Illumina公司收购Solexa公司,开发出

表1 二代测序平台特点^[5]

Table 1 The characters of NGS platforms

特点	454测序仪	Solexa测序仪	SOLiD测序仪	Ion Torrent测序仪
公司名称	Roche	Illumina	ABI	Life Technologies
文库构建	乳液PCR	桥式PCR	乳液PCR	乳液PCR
酶	聚合酶(焦磷酸测序)	聚合酶(可被切除的终止基团)	连接酶(由双碱基编码技术设计的8 bp长度探针)	聚合酶(pH微量变化场效应)
反应条件	基于焦磷酸反应的荧光体系	特殊修饰的dNTP	八核苷酸探针	普通dNTP
读长(bp)	700	150	50+50	400
适用样本类型	从头测序	基因组重测序	检测SNP、CHIP-seq	小基因组测序
机器价格(美元)	50万	45万	59万	5万
优点	读长最长	性价比最高	准确度最高;通量最高	速度最快
易错类型	插入或缺失突变	替换突变	替换突变	插入、缺失

以边合成边测序(sequencing by synthesis, SBS)为核心的测序仪:使用荧光标记的核苷酸及可逆的终止子dNTP,通过“去阻断-延伸-激发荧光-切割荧光基团-去阻断”的循环依次检测每个碱基与DNA模板链的结合,从而降低结合错误率,提高重复序列阅读的正确性。凭借其高性价比,Solexa也是目前市场占有率最高的测序仪,其测序流程如下。

3.1 文库制备

文库制备的目的是获得在两端均附加有接头

的核苷酸片段。首先利用雾化或超声波将DNA打断成100~200 bp长的小片段,在小片段两端加上接头,单链DNA片段的一端通过接头与芯片表面的引物碱基互补而被固定,另一端随机和附近的另外一个引物互补,形成桥状结构。

3.2 簇生成

簇生成主要包括以下5个步骤:首先是将分段后的文库制备样品杂交到流动槽表面,流动槽被细分成8个泳道,每个泳道的内表面有无数的被固定

的单链接头,可以容纳数百万的模板克隆;接下来在流动槽中进行桥式PCR,使DNA单分子成为单克隆DNA簇,达到测序所需要的信号要求;扩增后,片段线性化,使片段处于可测序状态;然后封闭片段,防止测序期间其他核苷酸添加到片段上;最后将测序引物杂交到片段上。

3.3 测序反应

合成反应中,加入DNA聚合酶、荧光可逆终止子dNTP和接头引物进行扩增。这些dNTP的3'-OH被化学方法所保护,因而每次只能添加一个dNTP。添加后,所有未使用的游离dNTP和DNA聚合酶都会被洗掉。在DNA簇延伸互补链时,每加入1个荧光标记dNTP就能释放出相应荧光,测序仪通过捕获荧光信号即可获得待测片段的序列信息。记录完成后,再加入化学试剂淬灭荧光信号并去除3'-OH保护基团,以便进行下一轮的测序反应。因为流动槽有8个泳道,Solexa每次可同时对8个不同的文库进行测序。

3.4 数据分析

加入缓冲液后,用激光激发荧光信号,并用光学设备完成记录,最后利用计算机将光学信号转化为测序碱基。将测序序列与参考基因组比对后可进行不同类型的分析。

4 二代测序分析SNP的优势

目前,法医DNA实验的检测主要是利用PCR-CE来检测STR的多态性信息。而常用的SNP分型方法则是基于PCR-CE的SNaPshot。与之相比,NGS分析SNP有如下优势。

4.1 操作简单,成本低廉

在样品准备步骤中,NGS用体外PCR法替代了以往转化大肠杆菌扩增质粒的繁琐过程。同时,通过将待测DNA片段克隆固定在芯片上,只需使用几微升的酶反应试剂,就可以测序芯片上的所有片段,从而极大地降低了测序费用。在反应步骤中,二代测序法无需CE,操作简便,对操作人员要求较低。

Solexa系统可由独立软件控制在5h内自动生成文库,且无需乳液PCR,减少了手工操作和污染可能性。而Ion Torrent测序仪由于无需特殊修饰的dNTP和昂贵的光学设备,成本更低,其售价仅为5万美元左右,为其他主流二代测序仪的1/10,因此更容易在应用型法医实验室普及。

4.2 分析能力强,通量高

PCR-CE平台的一个主要缺陷是无法同时测量

不同多态性,一次只能检测30~40个SNPs,需多次反复测量,而每次常规分析需要0.75~1.00 ng的DNA。因此,高度降解的生物材料难以被有效解析。而NGS可通过单次检测同时分析大量密集的SNP,能从微量的生物检材中挖掘出案件所需要的全部遗传学相关信息。且SNP凭其扩增长度短的特点,更加适合鉴别降解检材。美国国家标准与技术研究院Vallone团队研究发现,运用Ion Torrent系统的SNP体系对降解检材分型效果优于基于PCR-CE平台的STR、MiniSTR和InDel(insertion-deletion,插入缺失标记)体系。

凭借大规模平行测序的优势,NGS可获得极高的通量,有利于法医学文库的建立。Roche 454的GS FLX系统每运行10h就可测得超过100多万个读长400~600 bp的读段,读取超过4亿~6亿bp信息,2011年推出的GS FLX+系统产生的读长更是高达1000 bp,超过了传统的CE测序结果。而Solexa系统能在一次运行中产生读长100 bp,共计20 GB的数据。SOLiD3单次运行便可产生50 GB的序列数据,相当于17倍人类基因组覆盖度。

4.3 灵敏度高,精确度好

NGS的深度测序能力使其对大量扩增子具有极高的灵敏度,可从混合材料中检测到最小特异DNA分子,在灵敏度实验中MiSeq FGx系统仅需62.5 pg DNA的输入,就可以获得完整准确的基因型^[6]。但PCR-CE平台仅区分等位基因的片段大小,核苷酸数量相等的所有等位基因会被认为是同一个等位基因,因此PCR-CE平台经常会遗漏信息。而NGS能够分辨长度相同但碱基序列不同的等位基因,且STR内部的SNP、mtDNA SNP以及未知信号序列等都可以在核苷酸水平上被测出,测量结果相当精确。

4.4 Y-SNP的研究

在性犯罪案件中,Y染色体遗传标记对混合斑的鉴定明显优于常染色体遗传标记。由于Y-STR突变率较高,父系亲属间的Y-STR可能出现不一致的情况。而利用NGS对突变率低的Y-SNP进行分析则更加准确。在实际案例中,一种结合了NGS、CE和焦磷酸测序的“NGS+”技术可以有效检测Y-SNP,弥补Y-STR错配的不足,并成功地确认嫌疑人的血统^[7]。

5 二代测序分析SNP的法医学应用

目前,NGS技术在法医学中的应用多围绕SNP

展开。已有生物公司通过开发针对法医学应用的NGS检测平台和相关商品化试剂盒,促进这项新技术在法医工作的运用。

5.1 NGS检测平台

目前,最常用的法医学NGS测序平台分别是美国 Thermo Fisher 公司开发的个人染色体检测仪(ion personal genome machine, PGM)系统和美国 Illumina 公司开发的 Miseq FGx 系统。经比较发现 PGM 真阳性率更高, Miseq FGx 假阳性率更低。PGM 无需光学设备即可直接记录碱基合成过程,其标准文库仅需要 100 ng DNA,具有快捷、经济、便捷等特点。但由于 PGM 通过 pH 值变化识别相应的碱基,当模板链上出现单碱基重复时,相应的 dNTP 溶液易与多个碱基合成,造成 pH 大幅下降,因此 PGM 不适合高 AT、GC 基因组。

2015年1月发布的 MiSeq FGx 系统是首个专为法医基因组学应用而设计、经过充分验证的测序系统,以 15 倍的覆盖率充分覆盖检测基因,充分揭露重复序列内变异,从而提供对 STR 和 SNP 更强的鉴别能力^[6]。

5.2 NGS检测试剂盒

针对不同的 NGS 测序平台,推出不同的商业化试剂用于身份鉴定、系谱推断、祖先识别和表型确定等多种法医学应用领域。HID-Ion AmpliSeq 身份识别试剂盒是最早的商用法医学二代测序试剂,由美国 Thermo Fisher 公司于 2014 年发布,用于精确身份鉴定。其共包含 124 个 SNPs 位点,由 90 个常染色体 SNPs 和 34 个 Y-SNPs 组成^[8]。其后推出 169 个标志的 HID 试剂盒^[9],仅需 25~100 ng 样本就可以检测,具有高覆盖率。而 Zhang 等^[10]利用 AmpliSeq 技术制作的自定义 SNP 试剂盒,由 273 种 iiSNPs 组成,囊括了 233 个常染色体 SNPs,9 个 Y-SNPs 和 31 个 X-SNPs,最少仅需 1 ng DNA 样本即可获得可重复性结果,其检测内容与 Sanger 法所得高度一致。通过实验,他们总结出 257 个汉族独立多态的 SNPs 靶点。

为识别包括非洲、欧洲、东亚、北美、大洋洲在内的 5 大洲人群祖先来源,由 128 个标志物组成的 EUROFORGEN Global aiSNP 试剂盒被设计出用于辨认不同人群中平衡分化的核心特征^[11]。Thermo Fisher 公司也设计出由 165 个 SNPs 组成的 Precision ID Ancestry 试剂盒用于祖先推断。

而 Illumina 公司开发的 MiSeq FGx 配套的 Forenseq™ DNA Signature Prep 试剂盒,包含有 95 个常染色体 iiSNPs,56 个常染色体 aiSNPs 和 24 个与色素

有关的 piSNPs^[4],其中部分 piSNPs 来源于 HirisPlex 系统。

此外,还有由 140 个常染色体 SNPs 组成的,用于鉴定复杂的亲属关系的法医学试剂盒^[12]。该试剂盒包含 liSNP,最低可分析 0.2 ng DNA,对瑞典人群中的 49 个个体系谱推断能力强。以及以 Ion Torrent 平台为基础的 530Y-SNP^[13],包含了完整的 Y 染色体树,突破了之前 Y-SNP 分析工具只能同时关注有限的少量标志的缺陷,从而获得最多的系谱分析。100 pg 样本即可获得阳性结果,可分辨 432 个世界范围内的单体型。

6 结语和展望

综上,SNP 具有覆盖面广、突变率低、序列较短、易于自动化分析等特点,在基因推断、系谱推断、始祖推断和表型推断等法医学领域具有独特的优势。配合不断发展的 NGS 技术,在保证精确度和灵敏度的前提下,降低设备成本和操作难度。法医学家们可以借此找到更多有意义的位点,加强对降解检材的分析,建立更庞大的文库,从而更快地完成案件,甚至解决历史悬案。不过,NGS 分析 SNP 在法医学领域的应用依旧处于起步阶段,大规模引入应用前还需要进一步优化,期待未来的研究进展和突破。

[参考文献]

- [1] Yadav NK, Shukla P, Omer A, et al. Next generation sequencing: potential and application in drug discovery [J]. Scientific World Journal, 2014, 2014: 802437
- [2] Bose N, Carlberg K, Sensabaugh G, et al. Target capture enrichment of nuclear SNP markers for massively parallel sequencing of degraded and mixed samples [J]. Forensic Sci Int Genet, 2018, 34: 186-196
- [3] Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, et al. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information [J]. Forensic Sci Int Genet, 2011, 5(3): 170-180
- [4] Walsh S, Liu F, Wollstein A, et al. The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA [J]. Forensic Sci Int Genet, 2013, 7(1): 98-115
- [5] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(6): 333-351
- [6] Jager AC, Alvarez ML, Davis CP, et al. Developmental validation of the MiSeq FGx forensic genomics system for targeted next generation sequencing in forensic DNA case-work and database laboratories [J]. Forensic Sci Int Gen-

- 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 NLRP1-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