

丙泊酚对小胶质细胞焦亡的影响及其潜在机制

戴中亮, 田 迪, 张洪研, 高文莉, 林 苗, 宋意锋, 田 雅, 邢燕梅 (暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学第一附属医院, 深圳市人民医院麻醉科, 广东深圳 518020)

摘要: **目的** 探讨丙泊酚对小胶质细胞焦亡的影响及其潜在机制。**方法** 250 $\mu\text{mol/L}$ 丙泊酚处理小鼠小胶质 BV2 细胞 3 h, 检测线粒体膜电位、线粒体活性氧、线粒体呼吸链复合物 I 酶活性及 NLRP3、ASC、caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、LC3B、p62、COX4I1、cathepsin B 表达。**结果** 丙泊酚引起 BV2 细胞线粒体损伤、NLRP3 炎症小体介导的焦亡, 并抑制线粒体自噬。**结论** 丙泊酚可通过抑制线粒体功能介导 BV2 细胞焦亡。

关键词: 丙泊酚; 线粒体损伤; 线粒体自噬; 焦亡

中图分类号: R 614.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)05-0534-05

Effect and potential mechanism of propofol on microglial pyroptosis

DAI Zhong-liang, TIAN Di, ZHANG Hong-yan, GAO Wen-li, LIN Miao, SONG Yi-feng, TIAN Ya, XING Yan-mei (Department of Anesthesiology, Second Clinical Medical College of Jinan University, First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of and potential mechanism of propofol on microglial pyroptosis. **Methods** After treated with 250 $\mu\text{mol/L}$ propofol for 3 h, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, respiratory chain complex I enzyme activity, and expression of NLRP3, ASC, caspase-1, GSDMD, IL-1 β , LC3B, p62, COX4I1, and cathepsin B were determined in mouse microglia BV2. **Results** Propofol induced mitochondrial damage and NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis, and suppressed mitophagy in BV2 cells. **Conclusion** Propofol can mediate pyroptosis of BV2 cells via inhibiting mitochondrial function.

Key words: propofol; mitochondrial damage; mitophagy; pyroptosis

细胞焦亡是近年来发现并证实的一种新的程序性细胞死亡方式,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,形成细胞膜小孔,胞内物质(如乳酸脱氢酶等)流出,IL-1 β 、IL-18 前体裂解并诱导其他炎症因子、黏附分子等的合成和释放,放大局部和全身炎症反应是细胞焦亡发生的主要机制^[1-3]。丙泊酚(propofol, BBF)作为临床上应用最为广泛的麻醉药物之一,对机体的影响是复杂多样的。有研究已经证明 BBF 可以介导巨噬细胞通过 NOD 样受体家族核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症小体激活发生胱天蛋白酶-1(caspase1)依赖的炎症性死亡,即焦亡^[4]。

麻醉过程中的脑保护是近几年麻醉专业研究的热门问题。小胶质细胞作为神经系统的巨噬细胞,是人们研究脑保护和神经系统炎症的重点研究对象。线粒体产生的活性氧(ROS)^[5-8]和线粒体自噬^[9-11]和 NLRP3 炎症小体的激活密切相关。因此本研究探讨 BBF 暴露对小胶质细胞 ROS、线粒体自噬和焦亡的影响,旨在为 BBF 麻醉过程中的脑保护提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系和药物

小鼠小胶质细胞 BV2 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,产品货号 0356,以体积分数为 10% 的胎牛血清 DMEM 培养基常规培养。BBF 购自 Sigma 生物技术有限公司,批次 D126608。

1.2 实验仪器

荧光倒置显微镜(德国 Leica),生物安全柜(苏州市金净净化设备科技有限公司),低温离心机(济南云腾医疗器械有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组给药 实验分为对照组和 BBF 组两大

基金项目: 国家自然科学基金(No.81703263),广东省医学科研基金(No.A2019382),深圳市卫计委科研基金(No.SZXJ2017029)

收稿日期: 2021-03-03; **修订日期:** 2021-06-23

作者简介: 戴中亮(1978-),男,博士,副主任医师

组,对照组在BBF给药的同时更换空白培养基,BBF组用250 $\mu\text{mol/L}$ 的BBF暴露3 h,每组6个重复样本。

1.3.2 线粒体膜电位(MMP)的检测 MMP检测试剂盒(JC-1)购自碧云天生物技术有限公司,产品编号为C2006。BV2细胞BBF暴露以后根据试剂盒提示,JC-1工作液37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min以后收集样本进行检测。阳性对照组即CCCP组,在JC-1工作液处理之前以10 $\mu\text{mol/L}$ (DMEM培养基稀释)CCCP处理细胞40 min。在荧光倒置显微镜下摄片,用Image J统计荧光强度。

1.3.3 线粒体活性氧(mito-ROS)的检测 MitoSOX购自Invitrogen公司,货号M36008。BV2细胞BBF暴露以后根据说明书提示,MitoSOX染料用HBSS缓冲液稀释至5 $\mu\text{mol/L}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min以后收集样本进行检测。在荧光倒置显微镜下摄片,用Image J统计荧光强度。

1.3.4 线粒体呼吸链复合物I酶活性的检测 Complex I Enzyme Activity Microplate Assay试剂盒购自Abcam公司,货号ab109720。BV2细胞BBF暴露以后根据试剂盒步骤提示处理样本,实验操作结束以后用Dipstick扫描仪检测信号强度。

1.3.5 免疫印迹试验 Western blotting检测LC3B(abcam, ab192890)、p62(abcam, ab109012)、COX4I1(abcam, ab33985)、cathepsin B(abcam, ab214428)、NLRP3(CST, #15101)、ASC(CST, #67824)、caspase1(abcam, ab179515)、GSDMD(abcam, ab 209845)、IL-1 β (abcam, ab234437)和GAPDH(abcam, ab8245)的表达。BV2细胞BBF暴露以后,收集细胞蛋白备用。沉淀蛋白用BCA试剂盒(酶标仪562 nm)进行定量。经SDS-PAGE电泳分离,转膜,5% BSA封闭,一抗(Cytochrome C 1:5 000;其余一抗1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(12~14 h),HRP标记的二抗(GAPDH用山羊抗小鼠IgM 1:5 000;其余蛋白用山羊抗兔IgG 1:5 000)

室温1 h孵育,化学凝胶成像仪检测成像,最后Image J统计信号强度。

1.4 统计学处理

应用SPSS 20.0统计软件进行分析,采用单因素方差分析,如方差齐性选用LSD分析,如方差不齐选用Dunnett's T3分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBF暴露介导BV2细胞线粒体损伤

MMP检测结果显示,BBF处理后的BV2细胞MMP明显下降,GFP荧光强度明显增加($P<0.01$),RFP荧光强度明显降低($P<0.01$),见图1。Mito-ROS结果显示,BBF处理后的BV2细胞Mito-ROS生成显著增加($P<0.01$),见图2。线粒体Complex I酶活性检测结果显示,BBF处理后的BV2细胞Complex I酶活性受到显著抑制($P<0.01$),见图3。

2.2 BBF暴露抑制BV2细胞线粒体自噬

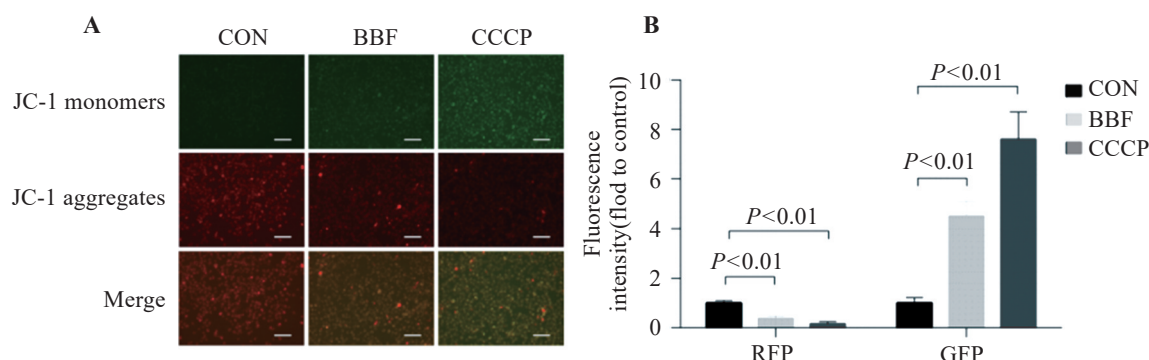
免疫印迹结果显示,BBF处理以后BV2细胞的蛋白p62($P<0.01$)和COX4I1($P<0.05$)的表达明显增加,LC3BII/I的比值明显降低($P<0.05$),Cathepsin B重链的表达明显增加($P<0.01$),Cathepsin B轻链的表达明显减少($P<0.05$),见图4。

2.3 BBF暴露介导BV2细胞焦亡

免疫印迹结果显示,BBF处理以后BV2细胞的蛋白NLRP3($P<0.01$)和ASC($P<0.05$)的表达显著增加,caspase1和GSDMD剪切带的表达显著增加($P<0.01$),白细胞介素-1 β (interleukin-1, IL-1 β)的剪切($P<0.05$)和分泌($P<0.01$)均显著增加。见图5。

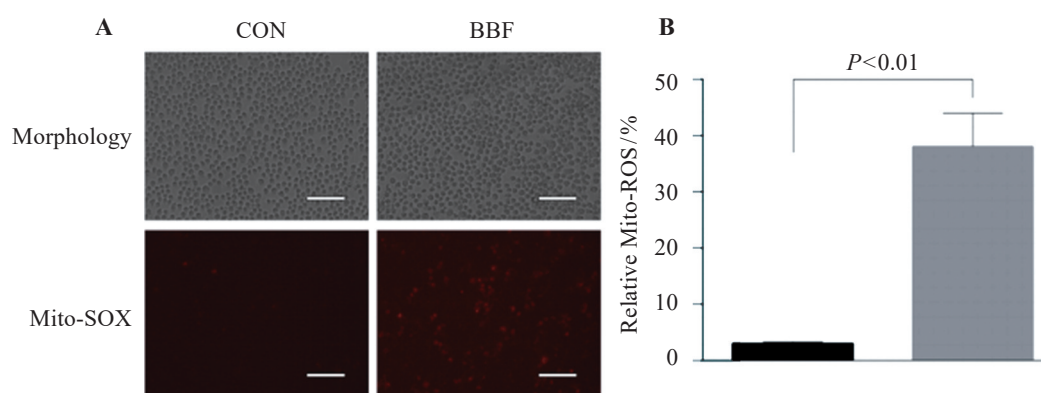
3 讨论

线粒体在细胞的稳态中起着非常关键的作用,能够为细胞的正常活动提供能量,对细胞的寿命起着决定性的作用^[12]。众所周知,自噬是消除受损或多余的



A. BV2细胞标记MMP特异性荧光探针JC-1的荧光图(放大倍数10 $\times$ 20); B. RFP和GFP的数据统计图($n=6$)

图1 BBF暴露降低BV2细胞的MMP



A. BV2 细胞标记 Mito-ROS 特异性荧光染料 mitoSOX 的荧光图 (放大倍数 10×20); B. Mito-ROX 的数据统计图 ($n=6$)

图2 BBF 暴露促进 BV2 细胞 Mito-ROS 的生成

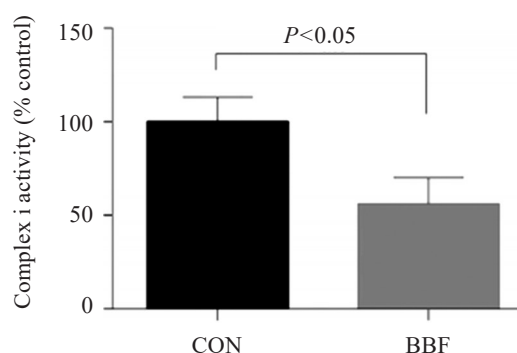


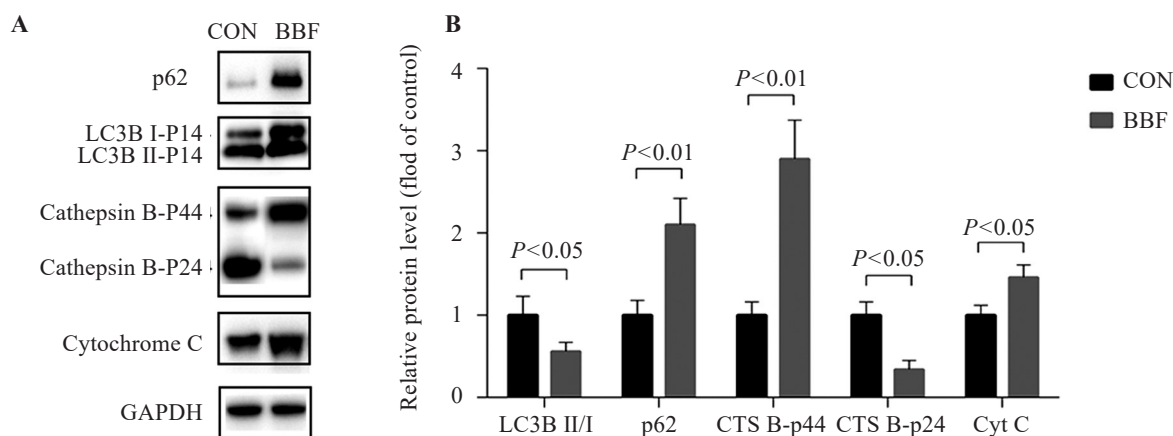
图3 BBF 暴露降低 BV2 细胞的线粒体复合物 I 的酶活性 ($n=6$)

线粒体的主要机制,称为线粒体自噬^[13]。而自噬通量障碍被认为是线粒体功能损伤,或者线粒体质量差的主要贡献者之一。而自噬通量障碍的两个关键因素是自噬小体的形成和物质的转运^[14-16]。因此本研究检测了线粒体损伤相关的指标(包括 MMP、mito-ROS、Complex I 酶活性)、线粒体自噬相关的指标(包括自噬标志蛋白 LC3B、SQSTM1/p62、COX4I1)以及自噬过

程中与溶媒体功能相关的酶。

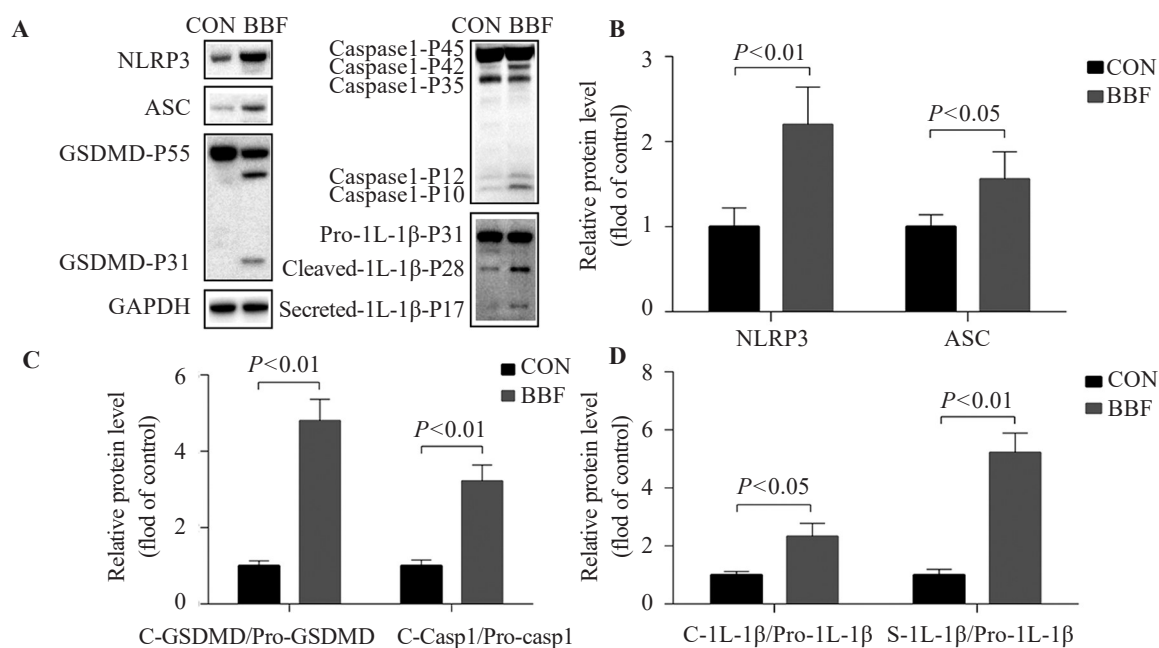
本研究结果显示,250 $\mu\text{mol/L}$ 的 BBF 处理可以导致 BV2 细胞 MMP 下降 ($P<0.01$),Complex I 酶活性下降 ($P<0.01$),mito-ROS 显著增加 ($P<0.01$),线粒体功能受到损伤;同时,LC3B II/I 的比值明显下降,COX4I1 和自噬底物蛋白 p62 的表达明显增加,提示 BBF 暴露导致线粒体自噬流阻滞。Cathepsin B 是自噬降解途径中研究最广泛的一种酶,与溶酶体降解功能息息相关^[17-18]。BBF 暴露后 Cathepsin B-p44 的显著增加和 Cathepsin B-p24 的显著减少,提示溶酶体的降解功能明显受到抑制。上面结果共同证明 BBF 可以抑制线粒体自噬。

线粒体自噬可以减少线粒体氧化应激引起的细胞应激^[19]。自噬作为真核生物细胞遭遇各种应激压力时发生的一种基本应答方式,参与细胞的多种生命活动,使细胞在各种应激条件下维持一种动态平衡状态。BBF 暴露使得小胶质细胞的自噬受到抑制,损伤



A. 自噬相关蛋白的 western blot 条带图; B. LC3BII/I、p62、Cathepsin B (CTS B) 和 COX4I1 的数据统计图

图4 BBF 暴露抑制 BV2 细胞的线粒体自噬 ($n=6$)



A. 焦亡相关蛋白的 western blot 条带图; B. NLRP3 和 ASC 的数据统计图; C. GSDMD 和 caspase1 活性剪切的数据统计图; D. IL-1 β 的活性剪切和细胞外分泌水平的数据统计图

图5 BBF暴露介导BV2细胞通过NLRP3/ASC炎症小体激活发生caspase1依赖的焦亡($n=6$)

或多余的细胞器清除障碍,毒性物质蓄积,细胞的正常生理活动受到影响,必然会衍生出一系列的病理情况出现,例如炎症小体的异常激活。NLRP3炎症小体是生物体内防御病原微生物的固有免疫防御系统的重要组成部分^[20]。NLRP3炎症小体通过激活caspase-1,从而促进IL-1 β 和白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)等促炎细胞因子的成熟和分泌,继而介导炎症的发生^[21]。自噬能够负向或正向调控NLRP3炎症小体的激活;同时NLRP3炎症小体也会逆向影响自噬的作用。ROS主要来源于线粒体^[22],当线粒体内膜上的电子传递链被破坏时,ROS会在细胞内积累,当达到一定水平时会产生毒性,是NLRP3炎症小体激活过程中重要的一环,并且起着正向促进作用^[23]。

有研究证明BBF可以促进巨噬细胞通过NLRP3/ASC途径发生caspase1依赖的焦亡^[24-26]。因此本研究对BBF暴露后BV2细胞的焦亡情况进行了检测,以期能够在小胶质细胞上得到进一步的验证。结果证明BBF暴露后,BV2细胞确实通过NLRP3/ASC途径发生焦亡,caspase1和GSDMD的活性剪切增加(均 $P < 0.01$),IL-1 β 的剪切和分泌均增加($P < 0.05$)。

本研究结果同时证明BBF可以抑制线粒体自噬,损伤线粒体功能,促进ROS生成,而自噬和ROS均是与NLRP3炎症小体激活密切相关的因素,而NL-

RP3炎症小体激活又证明可以活性剪切caspase1,促进焦亡终端标志GSDMD和IL-1 β 的剪切。

通过本研究,我们初步得出以下结论:BBF可以通过抑制线粒体自噬,导致受伤或者多余的线粒体清除障碍,BV2细胞线粒体整体功能受损,ROS生成增加,NLRP3/ASC炎症小体激活,caspase1活性剪切增加,其下游的GSDMD和IL-1 β 活性剪切增加,活性GSDMD在细胞膜打孔,细胞膜结构受损,大量剪切的IL-1 β 分泌到细胞外,形成炎性环境,BV2细胞肿胀破裂发生炎症性死亡。同时细胞的这种死亡方式会逆向影响线粒体自噬,形成恶性循环。当然BBF对自噬和焦亡的调节的具体过程还需要进一步确认,这是目前本研究存在的缺陷,有待在以后的研究中加以修正。

参考文献:

- [1] HE W T, WAN H Q, HU L C, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J]. Cell Res, 2015, 25(12):1285-1298.
- [2] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of Gasdermin D by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. Nature, 2015, 526(7575):660-665.
- [3] BROZ P. Immunology: Caspase target drives pyroptosis[J]. Nature, 2015, 526(7575):642-643.

- [4] SUN L, MA W, GAO W, et al. Propofol directly induces caspase-1-dependent macrophage pyroptosis through the NLRP3-ASC inflammasome[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8):542.
- [5] ABDERRAZAK A, SYROVETS T, COUCHIE D, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases[J]. *Redox Biol*, 2015, 4:296-307.
- [6] JO E K, KIM J K, SHIN D M, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2):148-159.
- [7] YU J W, LEE M S. Mitochondria and the NLRP3 inflammasome: Physiological and pathological relevance[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(11):1503-1518.
- [8] 张秋玉, 苏东辉, 李宁丽. 活性氧-适应性免疫应答的调节分子[J]. *现代免疫学*, 2008, 28(1):75-78.
- [9] YU S X, DU C T, CHEN W, et al. Genipin inhibits NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation via autophagy suppression[J]. *Sci Rep*, 2015, 11(5):17935.
- [10] WU J, LI J Y, ZHU G L, et al. The role of resveratrol-induced mitophagy/autophagy in peritoneal mesothelial cells inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 341(1):42-53.
- [11] LIU C, WANG J, YANG Y, et al. Ginsenoside Rd ameliorates colitis by inducing p62-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation in mice[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 155: 366-379.
- [12] CHEN G, KROEMER G, KEPP O. Mitophagy: An emerging role in aging and age-associated diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:200.
- [13] WANG Y, NARTISS Y, STEIPE B, et al. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8:1462-1476.
- [14] HERAS-SANDOVAL D, PÉREZ-ROJAS J M, HERNÁNDEZ-DAMIÁN J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration[J]. *Cell Signal*, 2014, 26: 2694-2701.
- [15] GIAIME E, TONG Y, WAGNER L K, et al. Age-dependent dopaminergic neurodegeneration and impairment of the autophagy-lysosomal pathway in LRRK-deficient mice[J]. *Neuron*, 2017, 96:796-807.
- [16] XILOURI M, BREKK O R, POLISSIDIS A, et al. Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats[J]. *Autophagy*, 2016, 12(11): 2230-2247.
- [17] KAMINSKY V, ZHIVOTOVSKY B. Proteases in autophagy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1824:44-50.
- [18] 胡喆, 梁就庆, 王晶晶, 等. 丙泊酚通过诱导自噬保护血管紧张素II引起细胞损伤[J]. *广东医科大学学报*, 2017, 3504: 333-336, 341.
- [19] YOULE R J, VAN DER BLIEK A M. Mitochondrial fission, fusion, and stress[J]. *Science*, 2012, 337(6098):1062-1065.
- [20] DE TORRE-MINGUELA C, MESA DEL CASTILLO P, PELEGRÍN P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:43.
- [21] JO E K, KIM J K, SHIN D M, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2):148-159.
- [22] IYER S S, HE Q, JANCZY J R, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation[J]. *Immunity*, 2013, 39(2):311-323.
- [23] HE Y, FRANCHI L, NÚÑEZ G. The protein kinase PKR is critical for LPS-induced iNOS production but dispensable for inflammasome activation in macrophages[J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(5):1147-1152.
- [24] NURMI K, KAREINEN I, VIRKANEN J, et al. Hemin and cobalt protoporphyrin inhibit NLRP3 inflammasome activation by enhancing autophagy: A novel mechanism of inflammasome regulation[J]. *J Innate Immun*, 2017, 9(1):65-82.
- [25] SPALINGER M R, LANG S, GOTTIER C, et al. PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner[J]. *Autophagy*, 2017, 13(9):1590-1601.
- [26] KO J H, YOON S O, LEE H J, et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NFκB pathways in autophagy- and p62-dependent manners[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):40817-40831.