

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.16.026

# 瑞马唑仑调节 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路对 LPS 诱导的神经元焦亡的影响

耿长振, 王利<sup>△</sup>, 叶兰

上海市公共卫生临床中心麻醉科, 上海 201500

**摘要:**目的 探讨瑞马唑仑(REM)调节 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)/消皮素 D(GSDMD)信号通路对脂多糖(LPS)诱导的神经元焦亡的影响。方法 将对数期小鼠海马神经元 HT22 细胞随机分为正常对照组(Ctrl 组)、LPS 诱导组(LPS 组, 10 mg/L LPS)、低浓度 REM 组(REM-低组, 160  $\mu$ mol/L REM)、高浓度 REM 组(REM-高组, 320  $\mu$ mol/L REM)和 REM-高+NLRP3 激活剂尼日利亚菌素组(REM-高+尼日利亚菌素组, 320  $\mu$ mol/L REM+10  $\mu$ mol/L 尼日利亚菌素)。除 Ctrl 组外, 其余各组 HT22 细胞均使用 LPS 进行诱导。各组加药处理后, 采用细胞计数试剂盒 8 测定 HT22 细胞的吸光度(A 值)。采用 Hoechst33342/碘化吡啶(PD)染色检测 HT22 细胞焦亡率。采用酶联免疫吸附试验检测 HT22 细胞上清液中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测 HT22 细胞中 NLRP3 信使 RNA(mRNA)、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平。采用蛋白质印迹法检测 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 和凋亡相关斑点样蛋白(ASC)表达水平。结果 LPS 组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值显著低于 Ctrl 组( $P < 0.05$ ), 而细胞焦亡率、上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 以及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 和蛋白表达水平、ASC 蛋白表达水平均显著高于 Ctrl 组( $P < 0.05$ )。REM-低组和 REM-高组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值显著高于 LPS 组, 且 REM-高组高于 REM-低组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而 REM-低组和 REM-高组 HT22 细胞焦亡率、上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 以及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 和蛋白表达水平、ASC 蛋白表达水平显著低于 LPS 组, 且 REM-高组低于 REM-低组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。REM-高+尼日利亚菌素组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值显著低于 REM-高组( $P < 0.05$ ), 而细胞焦亡率、上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 以及 NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 和蛋白表达水平、ASC 蛋白表达水平均显著高于 REM-高组( $P < 0.05$ )。结论 REM 可能通过下调 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路减轻 LPS 诱导的神经元焦亡。

**关键词:**瑞马唑仑; Nod 样受体蛋白 3/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1/消皮素 D 信号通路; 脂多糖; 神经元; 焦亡

中图分类号:R965;R446.8

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)16-2436-06

## Effect of remimazolam on LPS-induced neurons necrosis by regulating the NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling pathway

GENG Changzhen, WANG Li<sup>△</sup>, YE Lan

Department of Anesthesiology, Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201500, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of remimazolam (REM) on lipopolysaccharide (LPS) induced neurons pyroptosis by regulating the NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3)/cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1)/gasdermin D (GSDMD) signaling pathway. **Methods** Logarithmic phase mouse hippocampal neurons HT22 cells were randomly separated into a normal control group (Ctrl group), an LPS induction group (LPS group, 10 mg/L LPS), a low concentration REM group (REM low group, 160  $\mu$ mol/L REM), a high concentration REM group (REM high group, 320  $\mu$ mol/L REM) and a REM high+NLRP3 activator Nigerian antibiotic group (REM high+Nigerian antibiotic group, 320  $\mu$ mol/L REM+10  $\mu$ mol/L Nigerian antibiotic). Except for the Ctrl group, HT22 cells in all other groups were induced by LPS. After each group was treated with medication, the CCK-8 method was applied to determine the absorbancy (A value) of HT22 cells. Hoechst33342/pyridine iodide (PI) staining was applied to detect the level of pyroptosis rate in HT22 cells. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the supernatant of HT22

cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction was applied to detect the expression levels of NLRP3 message RNA (mRNA), Caspase-1 mRNA and GSDMD mRNA in HT22 cells. Western blot was applied to detect the expression of NLRP3, Caspase-1, GSDMD and apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in HT22 cells. **Results** The  $A_{450}$  values at 48 h and 72 h in HT22 cells in the LPS group were obviously lower than those in the Ctrl group ( $P < 0.05$ ), while the cell apoptosis rate, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  levels in the supernatant, NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA and protein expression levels, and ASC protein expression level were obviously higher than those in the Ctrl group ( $P < 0.05$ ). The  $A_{450}$  values at 48 h and 72 h in HT22 cells in the REM low group and REM high group were obviously higher than those in the LPS group, which in the REM high group were obviously higher than those in the REM low group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The cell apoptosis rate, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  levels in the supernatant, NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA and protein expression levels, and ASC protein expression level in the REM low group and REM high group were obviously lower than those in the LPS group, which in the REM high group were obviously lower than those in the REM low group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The  $A_{450}$  values at 48 h and 72 h in HT22 cells in the REM high + Nigerian antibiotic group were obviously lower than those in the REM high group ( $P < 0.05$ ), while the cell apoptosis rate, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  levels in the supernatant, NLRP3, Caspase-1, GSDMD mRNA and protein expression levels, and ASC protein expression level in the REM high + Nigerian antibiotic group were obviously higher than those in the REM high group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** REM may alleviate LPS induced neuronal pyroptosis by downregulating the NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway.

**Key words:** remimazolam; NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3/cysteinyl aspartate specific proteinase-1/gasdermin D signaling pathway; lipopolysaccharides; neurons; pyroptosis

神经炎症是众多中枢神经系统疾病如脑缺血再灌注损伤、阿尔茨海默病、帕金森综合征等的重要病理机制之一,在神经系统疾病的病理进程中具有关键作用,能对神经元造成严重损伤<sup>[1-2]</sup>。有研究发现,细胞焦亡在促进神经炎症的发生、发展中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。细胞焦亡是与炎症因子释放增加和炎症小体激活相关的细胞死亡方式。因此,临床寻找抑制细胞焦亡的相关药物,对于改善神经炎症具有重要意义<sup>[5]</sup>。瑞马唑仑(REM)是临床常用的超短效苯二氮卓类镇静药物,在临床及ICU重症患者手术中常用来进行麻醉诱导<sup>[6]</sup>。有研究发现,REM能够通过维持血脑屏障完整、抑制神经炎症反应和氧化应激,减少神经元凋亡,减轻脓毒症小鼠的脑损伤<sup>[7]</sup>。然而,关于REM对神经元焦亡的影响还鲜有报道。Nod样受体蛋白3(NLRP3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)/消皮素D(GSDMD)信号通路是细胞焦亡的经典信号通路,炎症小体NLRP3通过激活Caspase-1前体蛋白,促使其裂解并通过GSDMD使成熟的炎症因子释放,进一步驱动神经炎症和神经元焦亡的发生<sup>[8-9]</sup>。基于此,本研究通过采用脂多糖(LPS)诱导神经元焦亡模型,探究REM对神经元焦亡的影响和具体机制。现报道如下

## 1 材料与方法

**1.1 细胞和培养方式** 小鼠海马神经元HT22细胞由无锡欣润生物科技公司提供,细胞复苏后使用含10%胎牛血清、1%双抗(青霉素与链霉素)的DMEM

高糖培养基培养,置于37℃恒温、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中孵育。隔天更换新鲜培养基,传代3次后取对数期HT22细胞进行分组和给药。

**1.2 主要试剂** REM注射液购自美国TargetMol公司(给药时用无血清培养基稀释到所用浓度);DMEM高糖培养基、双抗溶液、胎牛血清购自美国Merck公司;尼日利亚菌素购自美国Thermo Fisher公司;细胞计数试剂盒8(CCK-8)检测试剂盒、碘化吡啶(PI)、Hoechst 33342购自美国Sigma公司;白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自武汉博士德生物工程公司;抗NLRP3、Caspase-1、GSDMD、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)多克隆抗体及HRP标记免疫球蛋白G(IgG)购自北京安诺伦生物公司;Trizol试剂、反转录试剂盒等实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)所用试剂购自北京天根生化科技有限公司。

**1.3 细胞分组与给药** 将对数期HT22细胞接种在96孔板上,调整细胞浓度为 $1 \times 10^4$ 个/孔,随机分为正常对照组(Ctrl组)、LPS诱导组(LPS组,10 mg/L LPS<sup>[10]</sup>)、低浓度REM组(REM-低组,160  $\mu$ mol/L REM)、高浓度REM组(REM-高组,320  $\mu$ mol/L REM<sup>[11]</sup>)和高浓度REM+NLRP3激活剂尼日利亚菌素组(REM-高+尼日利亚菌素组,320  $\mu$ mol/L REM+10  $\mu$ mol/L尼日利亚菌素<sup>[12]</sup>)。除Ctrl组外,其余各组HT22细胞均使用LPS诱导24 h后加入相应药物进行处理。

**1.4 CCK-8 法测定 HT22 细胞活力** 各组 HT22 细胞加入相应药物处理 24、48、72 h 后,分别加入 CCK-8 试剂并用酶标仪检测各孔 2 h 后 450 nm 下的吸光度(A 值)。重复 6 次取平均值。

**1.5 Hoechst33342/PI 染色检测 HT22 细胞焦亡水平** 各组 HT22 细胞加入相应药物处理 48 h 后,弃去培养基。分别加入细胞染色缓冲液、Hoechst33342 染色液和 PI 染色液,摇匀后在 4 °C 暗处孵育 30 min,洗涤后在荧光显微镜下观察计算 PI 阳性细胞的比例(PI 阳性的细胞呈红色,Hoechst33342 阳性的细胞呈蓝色)。重复 6 次取平均值。

**1.6 ELISA 法检测 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平** 各组 HT22 细胞加入相应药物处理 48 h 后,离心收集细胞上清液。采用 ELISA 试剂盒检测各组 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平。重复 6 次取平均值。

**1.7 RT-qPCR 法检测 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 信使 RNA(mRNA)表达水平** 加入 Trizol 试剂提取各组 HT22 细胞总 RNA,定性和浓度测定后将 RNA 反转录为互补 DNA,以其为模板进行 PCR 扩增。反应程序和反应体系按照 SYBR Ex Taq II 试剂盒说明书进行设置。引物序列设计如表 1 所示。采用 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  方法计算 NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 的表达水平。重复 6 次取平均值。

表 1 引物设计序列

基因名称	引物序列(5'-3')
NLRP3	F:GCTTGCCGACGATGCCTTCC
	R:GCTGTCATTGTCTGGTGTCTTCC
Caspase-1	F:TCCTCAGGCTCAGAAGGGAATGTC
	R:GTGCGGCTTGACTTGTCCATTATTG
GSDMD	F:GCCTCCACAACCTCCTGACAGATG
	R:GGTCTCCACCTCTGCCCGTAG
GAPDH	F:CAATGTGTCCGTCGTGGATCT
	R:GTCTCAGTGTAGCCCAAGATG

注:F 表示正向引物;R 表示反向引物。

**1.8 蛋白质印迹法检测 HT22 细胞中焦亡经典信号通路 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 及凋亡相关斑点样蛋白(ASC)表达水平** 采用蛋白裂解液提取各组 HT22 细胞的蛋白,并采用二辛可宁酸(BCA)法定量。用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离每个样品中的蛋白质,300 A 恒流转膜。室温条件下封闭后,加入 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC、GAPDH(稀释比均为 1 : 1 000)一抗摇床孵育过夜(4 °C 条件)。加入相应二抗(1 : 4 000),室温孵育 2 h,加入电化学发光(ECL)试剂曝光显影,以 GAPDH 蛋白作为内参,计算目标蛋白的灰度值。重复 6 次取平均值。

**1.9 统计学处理** 采用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 5 组 HT22 细胞不同时间点 A<sub>450</sub> 值比较** 5 组 HT22 细胞 24 h 的 A<sub>450</sub> 值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。LPS 组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值显著低于 Ctrl 组( $P < 0.05$ );REM-低组和 REM-高组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值显著高于 LPS 组( $P < 0.05$ ),且 REM-高组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值高于 REM-低组( $P < 0.05$ );REM-高+尼日利亚菌素组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值显著低于 REM-高组( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 5 组 HT22 细胞不同时间点 A<sub>450</sub> 的比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	24 h	48 h	72 h
Ctrl 组	0.23 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.06	1.07 $\pm$ 0.11
LPS 组	0.24 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.03*	0.59 $\pm$ 0.06*
REM-低组	0.23 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>	0.74 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>
REM-高组	0.22 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.06 <sup>#&amp;</sup>	0.93 $\pm$ 0.09 <sup>#&amp;</sup>
REM-高+尼日利亚菌素组	0.23 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.04 $\Delta$	0.69 $\pm$ 0.07 $\Delta$
<i>F</i>	0.278	48.000	33.375
<i>P</i>	0.890	<0.001	<0.001

注:与 Ctrl 组相比,\* $P < 0.05$ ;与 LPS 组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与 REM-低组相比,<sup>&</sup> $P < 0.05$ ;与 REM-高组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

**2.2 5 组 HT22 细胞焦亡率比较** Ctrl 组 HT22 细胞焦亡率为(3.75 $\pm$ 0.87)%,LPS 组为(27.66 $\pm$ 3.05)%,REM-低组为(19.26 $\pm$ 1.96)%,REM-高组为(8.52 $\pm$ 0.97)%,REM-高+尼日利亚菌素组为(22.38 $\pm$ 2.72)%,5 组 HT22 细胞焦亡率比较,差异有统计学意义( $F = 132.500, P < 0.001$ );LPS 组 HT22 细胞焦亡率显著高于 Ctrl 组( $P < 0.05$ ),REM-低组和 REM-高组 HT22 细胞焦亡率显著低于 LPS 组( $P < 0.05$ ),且 REM-高组 HT22 细胞焦亡率低于 REM-低组( $P < 0.05$ );REM-高+尼日利亚菌素组 HT22 细胞焦亡率显著高于 REM-高组( $P < 0.05$ )。见图 1。

**2.3 5 组 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平比较** 5 组 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );LPS 组 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著高于 Ctrl 组( $P < 0.05$ );REM-低组和 REM-高组 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著低于 LPS 组( $P < 0.05$ ),且 REM-高组 HT22 细

胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平低于 REM-低组 ( $P < 0.05$ ); REM-高 + 尼日利亚菌素组 HT22 细

胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著高于 REM-高组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

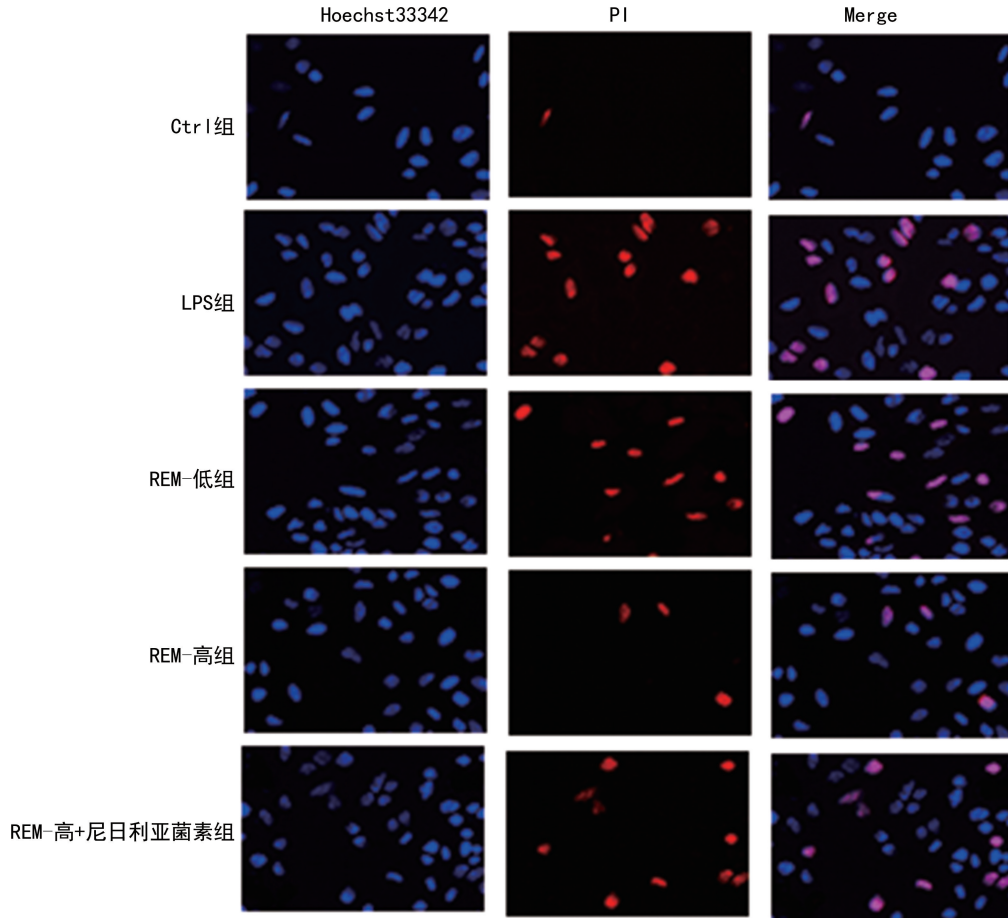


图 1 Hoechst33342/PI 染色观察 HT22 细胞凋亡 ( $\times 200$ )

表 3 5 组 HT22 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
Ctrl 组	1.46 $\pm$ 0.17	46.88 $\pm$ 3.73	14.32 $\pm$ 1.76
LPS 组	5.42 $\pm$ 0.33*	108.28 $\pm$ 7.49*	38.49 $\pm$ 3.11*
REM-低组	4.02 $\pm$ 0.35 <sup>#</sup>	83.49 $\pm$ 8.80 <sup>#</sup>	28.16 $\pm$ 2.45 <sup>#</sup>
REM-高组	2.24 $\pm$ 0.27 <sup>#&amp;</sup>	56.68 $\pm$ 5.14 <sup>#&amp;</sup>	16.59 $\pm$ 1.73 <sup>#&amp;</sup>
REM-高+尼日利亚菌素组	4.36 $\pm$ 0.50 $\Delta$	89.17 $\pm$ 6.56 $\Delta$	34.75 $\pm$ 3.10 $\Delta$
<i>F</i>	134.331	86.053	110.230
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Ctrl 组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS 组相比, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ ; 与 REM-低组相比, <sup>&</sup>  $P < 0.05$ ; 与 REM-高组相比,  $\Delta$   $P < 0.05$ 。

**2.4 5 组 HT22 细胞 NLRP3、Caspase-1、GSDMD mRNA 表达水平比较** 5 组 HT22 细胞 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); LPS 组 HT22 细胞中 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平显著高于 Ctrl 组 ( $P < 0.05$ ); REM-

低组和 REM-高组 HT22 细胞中 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平显著低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ ), 且 REM-高组 HT22 细胞中 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平低于 REM-低组 ( $P < 0.05$ ); REM-高 + 尼日利亚菌素组 HT22 细胞中 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平显著高于 REM-高组 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 5 组 HT22 细胞 NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA、GSDMD mRNA 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	NLRP3 mRNA	Caspase-1 mRNA	GSDMD mRNA
Ctrl 组	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.10
LPS 组	1.87 $\pm$ 0.19*	2.10 $\pm$ 0.21*	1.97 $\pm$ 0.20*
REM-低组	1.57 $\pm$ 0.16 <sup>#</sup>	1.83 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup>	1.68 $\pm$ 0.17 <sup>#</sup>
REM-高组	1.28 $\pm$ 0.13 <sup>#&amp;</sup>	1.50 $\pm$ 0.15 <sup>#&amp;</sup>	1.46 $\pm$ 0.15 <sup>#&amp;</sup>
REM-高+尼日利亚菌素组	1.63 $\pm$ 0.16 $\Delta$	1.87 $\pm$ 0.19 $\Delta$	1.74 $\pm$ 0.17 $\Delta$
<i>F</i>	29.724	38.078	32.694
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Ctrl 组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与 LPS 组相比, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ ; 与 REM-低组相比, <sup>&</sup>  $P < 0.05$ ; 与 REM-高组相比,  $\Delta$   $P < 0.05$ 。

**2.5 5 组 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD**

及 ASC 蛋白表达水平比较 5 组 HT22 细胞中 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路相关蛋白表达水平比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); LPS 组 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC 蛋白表达水平显著高于 Ctrl 组 ( $P < 0.05$ ); REM-低组和 REM-高组 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSD-

MD、ASC 蛋白表达水平显著低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ ), 且 REM-高组 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC 蛋白表达水平低于 REM-低组 ( $P < 0.05$ )。REM-高+尼日利亚菌素组 HT22 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC 蛋白表达水平显著高于 REM-高组 ( $P < 0.05$ )。见表 5、图 2。

表 5 5 组 HT22 细胞 NLRP3、Caspase-1、GSDMD 及 ASC 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	NLRP3	Caspase-1	GSDMD	ASC
Ctrl 组	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.03
LPS 组	0.79 ± 0.08 <sup>*</sup>	0.85 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.93 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.98 ± 0.10 <sup>*</sup>
REM-低组	0.58 ± 0.06 <sup>#</sup>	0.67 ± 0.07 <sup>#</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>#</sup>	0.75 ± 0.08 <sup>#</sup>
REM-高组	0.33 ± 0.03 <sup>#&amp;</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>#&amp;</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>#&amp;</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>#&amp;</sup>
REM-高+尼日利亚菌素组	0.61 ± 0.06 <sup>△</sup>	0.70 ± 0.07 <sup>△</sup>	0.76 ± 0.08 <sup>△</sup>	0.79 ± 0.08 <sup>△</sup>
F	111.483	97.281	98.699	79.790
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 Ctrl 组相比, \*  $P < 0.05$ ;与 LPS 组相比, #  $P < 0.05$ ;与 REM-低组相比, &  $P < 0.05$ ;与 REM-高组相比, △  $P < 0.05$ 。

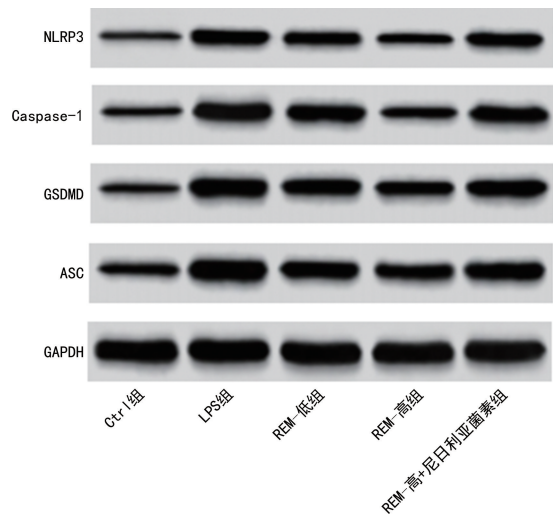


图 2 蛋白质印迹法检测 HT22 细胞中 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路相关蛋白的表达

### 3 讨 论

细胞焦亡是与炎症因子释放增加和炎症小体激活相关的细胞死亡方式, 其主要通过识别 NLRP3 炎症小体, 激活 Caspase-1 进而促进大量炎症因子的释放, 导致细胞死亡<sup>[13-14]</sup>。现阶段研究发现, 细胞焦亡是神经炎症疾病的主要病理机制之一, 其与神经元的损伤和死亡具有密不可分的联系<sup>[15]</sup>。因此, 临床寻找抑制细胞焦亡的相关药物, 对于改善神经炎症疾病具有重要意义。本研究通过 LPS 诱导神经元 HT22 细胞发生细胞焦亡, 发现 LPS 诱导后 HT22 细胞的 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值降低, 细胞焦亡率及上清液炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高。这说明 LPS 能够诱导神经元发生细胞焦亡, 造成细胞活力降低和炎症因子的释放。

REM 是一种新型的苯二氮卓类镇静催眠药物,

其能通过靶向  $\gamma$ -氨基丁酸 a 受体, 对机体起到快速麻醉和苏醒的作用, 且安全性高, 对呼吸抑制的影响较小, 除了具有优越的镇静麻醉作用, 还对神经系统疾病如脑损伤等具有一定的影响<sup>[16]</sup>。SHI 等<sup>[17]</sup>研究发现 REM 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体通路介导的细胞焦亡对脑缺血再灌注损伤具有改善作用, 改善神经功能障碍。段梅等<sup>[18]</sup>通过体内实验研究发现 REM 能够减轻脑缺血再灌注损伤引起的炎症反应, 发挥其脑神经保护作用, 这可能与靶向调控蛋白激酶 B/核因子- $\kappa$ B 信号通路有关。本研究发现经过 REM 干预后的 LPS 组 HT22 细胞 48、72 h 的 A<sub>450</sub> 值升高, 细胞焦亡率及 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低。这与先前的研究者们发现 REM 对脑神经具有保护作用一致, 这可能是由于 REM 能通过抑制神经元焦亡和一系列炎症反应的发生有关。

NLRP3/Caspase-1/GSDMD 是细胞焦亡相关的经典信号通路, NLRP3 炎症小体能够激活 Caspase-1, 导致促炎性细胞因子成熟, 同时切割 GSDMD, 进而使成熟后的促炎性细胞因子从 GSDMD-N 形成的蛋白孔释放, 进而促进细胞焦亡的发生<sup>[19]</sup>。ASC 是 NLRP3 炎症小体的组成成分, 与细胞焦亡的发生紧密相关<sup>[20]</sup>。YANG 等<sup>[21]</sup>研究发现硫化氢可以通过下调 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路对中枢神经系统的脑缺血再灌注损伤诱导的神经炎症具有保护作用。齐雅芝等<sup>[22]</sup>研究发现延胡索总生物碱可能通过调控 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路, 减少炎症因子分泌, 抑制神经元焦亡, 从而对戊四氮诱导的慢性癫痫大鼠起到治疗作用。本研究发现 LPS 诱导 HT22 细胞后, 细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC 等细胞焦亡相关蛋白均显著上调。低、高浓

度 REM 干预后细胞中 NLRP3、Caspase-1、GSDMD、ASC 蛋白表达水平下调。这与 YANG 等<sup>[21]</sup>、齐雅芝等<sup>[22]</sup>的研究结果一致,这说明抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路能够减轻神经元细胞的焦亡,进而对一系列脑部疾病、损伤或精神性疾病具有治疗作用。而且 NLRP3 激活剂尼日利亚菌素减弱了 REM 对 LPS 诱导的神经元焦亡的抑制作用。这说明 REM 可能通过下调 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路减轻 LPS 诱导的神经元焦亡。

综上所述,REM 可能通过下调 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 信号通路减轻 LPS 诱导的神经元焦亡。本研究为 REM 对于神经炎症及相关中枢神经系统疾病的临床治疗提供了新的参考和科学依据,但具体的疗效还需在体内水平上如动物实验、临床试验中进行进一步验证。

### 参考文献

[1] ZHOU R,JI B,KONG Y,et al. PET imaging of neuroinflammation in alzheimer's disease[J]. *Front Immunol*, 2021,12(1):739-749.

[2] JURCAU A,SIMION A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,23(1):14.

[3] WANG S,YUAN Y H,CHEN N H,et al. The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease[J]. *Int Immunopharmacol*,2019,67:458-464.

[4] DING R,LI H Y,LIU Y Q,et al. Activating cGAS-STING axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1):137.

[5] ZHANG Q,JIA M,WANG Y F,et al. Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*,2022,47(12):3525-3542.

[6] 李帆,李小民,黄守秋,等. 瑞马唑仑用于 ICU 机械通气患者的安全性和有效性[J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*,2023,18(3):353-357.

[7] 郭小丽,杨昌明,王婵,等. 基于 Sirt1/FoxO1 通路探讨瑞马唑仑减轻脓毒症小鼠脑损伤的机制研究[J]. *中国实验动物学报*,2023,31(1):82-90.

[8] YAO F,JIN Z,ZHENG Z H,et al. HDAC11 promotes both NLRP3/caspase-1/GSDMD and caspase-3/GSDME pathways causing pyroptosis via ERG in vascular endothelial cells[J]. *Cell Death Discov*,2022,8(1):112.

[9] LIU J B,JIA A A,YANG Y,et al. Exercise induced meteorin-like protects chondrocytes against inflammation and pyroptosis in osteoarthritis by inhibiting PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B and NLRP3/caspase-1/GSDMD signaling[J]. *Bi-*

omed Pharmacother,2023,158:114118.

[10] 王京燕,丁慧,钟薇薇,等. 艾司氯胺酮减轻 HT22 细胞炎症损伤及铁死亡相关机制[J]. *中国药理学通报*,2022,38(11):1647-1654.

[11] 严智文,张亮,王春雨,等. 瑞马唑仑调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *微循环学杂志*,2023,33(3):1-5.

[12] 王希,闫战秋,贾旺,等. 咪达唑仑通过 NLRP3/caspase-1 途径改善脂多糖诱导 H9c2 心肌细胞损伤[J]. *医学分子生物学杂志*,2022,19(4):269-275.

[13] GU L G,SUN M J,LI R H,et al. Microglial pyroptosis: Therapeutic target in secondary brain injury following intracerebral hemorrhage[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16:971469.

[14] HU X L,CHEN H W,XU H,et al. Role of pyroptosis in traumatic brain and spinal cord injuries[J]. *Int J Biol Sci*, 2020,16(12):2042-2050.

[15] SONG Y Q,LIN W J,HU H J,et al. Sodium tanshinone II A sulfonate attenuates sepsis-associated brain injury via inhibiting NOD-like receptor 3/caspase-1/gasdermin D-mediated pyroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 118:110111.

[16] TANG S,LU J X,XU C,et al. Feasibility and safety of remazolam versus propofol when inserting laryngeal masks without muscle relaxants during hysteroscopy[J]. *Drug Des Devel Ther*,2023,17:1313-1322.

[17] SHI M,CHEN J,LIU T X,et al. Protective effects of remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis[J]. *Drug Des Devel Ther*,2022,16:413-423.

[18] 段梅,刘佳,张静,等. 瑞马唑仑对脑缺血再灌注损伤模型大鼠神经的保护作用及其机制[J]. *精准医学杂志*, 2023,38(4):345-349.

[19] YAN H L,LUO B,WU X Y,et al. Cisplatin induces pyroptosis via activation of MEG3/NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Int J Biol Sci*,2021,17(10):2606-2621.

[20] SHAO B Z,WANG S L,PAN P,et al. Targeting NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel disease:putting out the fire of inflammation[J]. *Inflammation*, 2019, 42(4): 1147-1159.

[21] YANG K L,LI W H,LIU Y J,et al. Hydrogen sulfide attenuates neuroinflammation by inhibiting the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway in retina or brain neuron following rat ischemia/reperfusion[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(9):1245.

[22] 齐雅芝,唐姬,李君,等. 延胡索总生物碱对慢性癫痫大鼠皮层 NLRP3/caspase-1/GSDMD 介导的细胞焦亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*,2023,39(11):1938-1946.