

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.13.007

文章编号: 1005-8982 (2024) 13-0049-08

实验研究·论著

4种程序性细胞死亡方式在轻型颅脑损伤中的发展探究*

王恬恬, 赵乐, 冯忆, 魏楠楠, 刘骥肇, 高丽, 王永辉

(山西中医药大学基础医学院, 山西 晋中 030619)

摘要: **目的** 研究4种程序性细胞死亡方式(凋亡、自噬、焦亡、铁死亡)在轻型颅脑损伤中随时间的发生、发展。**方法** 选取SPF级Wistar大鼠49只, 复制轻型颅脑损伤大鼠模型。7只为空白对照组, 42只为模型组; 模型组分别于模型复制成功后第1天、第3天、第7天、第14天、第21天和第28天取材。采用苏木精-伊红(HE)染色、尼氏染色、铀铅双染法观察大鼠海马神经元微观结构的变化; Western blotting检测各组大鼠海马B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)、铁蛋白重链(FTH)、天冬氨酸-胱氨酸特异性蛋白酶家族1(Caspase-1)蛋白表达。**结果** 光学显微镜可见, 模型组有神经元皱缩等现象。电镜及Western blotting结果显示, 与空白对照组比较, 模型组第1天神经元细胞轻度固缩, Bcl-2蛋白相对表达量较高($P < 0.05$); 模型组第3天、第7天的细胞膜多处破损, 细胞器部分肿胀; 模型组第3天的Caspase-1蛋白相对表达量达到最高峰($P < 0.05$); 模型组第14天的神经元线粒体嵴多局部断裂, FTH蛋白相对表达量也较高($P < 0.05$); 模型组第28天的FTH蛋白相对表达量仍在升高($P < 0.05$); 模型组第28天胞内可见少量初级溶酶体或自噬溶酶体, 但模型组第28天的LC3B蛋白相对表达量较模型组第21天降低($P < 0.05$)。**结论** 轻型颅脑损伤后较多神经元细胞第一时间选择凋亡, 焦亡紧随其后, 铁死亡较晚发生, 自噬持续性进行。

关键词: 神经元; 轻型颅脑损伤; 凋亡; 自噬; 铁死亡; 焦亡

中图分类号: R741

文献标识码: A

Exploration of development of four programmed cell death modes in mild traumatic brain injury*

Wang Tian-tian, Zhao Le, Feng Yi, Wei Nan-nan, Liu Qi-zhao, Gao Li, Wang Yong-hui

(School of Basic Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China)

Abstract: Objective To investigate the occurrence and development of four programmed cell death modes (apoptosis, autophagy, pyroptosis, and ferroptosis) in mild traumatic brain injury with time. **Methods** 49 SPF Wistar rats were used to replicate the rat model with mild traumatic brain injury. 7 were blank group and 42 were model group. Samples were collected at day 1, day 3, day 7, day 14, day 21 and day 28 after the successful replication of the model. The microstructure of rat hippocampal neurons was observed by hematoxylin-eosin (HE), Nissl's staining, uranium lead double staining, respectively. Western blotting was used to detect the expressions of Bcl-2, LC3B, FTH and caspase1 proteins in the hippocampus of each group of rats. **Results** Optical microscopy showed that the neurons in the model group were crumpled. The results of electron microscopy and Western blotting showed that compared with the blank control group, the neurons in the model group were slightly contracted at day 1,

收稿日期: 2023-08-25

* 基金项目: 国家自然科学基金(No:82104972); 山西省卫生健康委科研项目(No:2021041); 山西省中医药管理局科研课题计划(No:2022ZYC267); 山西中医药大学博士科研启动基金资助(No:2022BK019); 山西中医药大学科技创新能力培育计划(No:2023PY-YS-03)

[通信作者] 王永辉, E-mail: wyh766188@sina.com; Tel: 18636117158

and the relative expression of Bcl-2 protein was higher ($P < 0.05$). In the model group, the cell membrane was damaged in many places and the organelles were swollen at day 3 and day 7. The expression of caspase1 protein in the model group reached the highest level at day 3 ($P < 0.05$). On the 14th day of the model group, the mitochondrial ridge of neurons was broken more locally, and the relative expression of FTH protein was also higher ($P < 0.05$). The relative expression of FTH protein in the model group was still increased on day 28 ($P < 0.05$); There was a small amount of primary lysosome or autophagic lysosome in the cells of the model group on day 28, but the relative expression level of LC3B protein in the model group on day 28 was lower than that on day 21 ($P < 0.05$).

Conclusion After mild traumatic brain injury, more neurons chose apoptosis at the first time, pyroptosis followed, ferroptosis occurred later, and autophagy continued.

Keywords: neuron; mild traumatic brain injury model; apoptosis; autophagy; ferroptosis; pyroptosis

全球每年有 1/1 000 的人患有轻型颅脑损伤^[1]; 中国每年颅脑损伤人群的病死率达 0.07%^[2]。其中,大多数患者的临床症状是由轻型颅脑损伤后继发性损伤引起的^[3],继发性损伤在原发性损伤数分钟或数天后,通过多途径、多环节^[4],造成二次脑组织损伤,使神经元直接或间接死亡、降解,此过程主要发生在与原发性坏死区域有部分距离的存活细胞^[5]。已有研究声称,颅脑损伤后神经元细胞死亡可能通过细胞凋亡、坏死性凋亡、自噬、焦亡、铁死亡发生^[6-7]。已有研究报道凋亡、自噬、铁死亡等在颅脑损伤后的连续性变化,某些死亡方式相关生物标志物在损伤后数分钟或数天达峰值^[8];或其标志物的高表达可持续数周至数月^[9-11]。但尚无研究报道焦亡在颅脑损伤后的连续性变化,且目前尚无上文提及的凋亡、自噬、铁死亡、焦亡 4 种死亡方式在轻型颅脑损伤中随时间变化的报道。故本文从轻型颅脑损伤入手,探讨神经元的 4 种死亡方式在不同时间节点上的变化,以期为后续阐明轻型颅脑损伤后继发性损伤的病理机制提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

49 只 SPF 级 Wistar 大鼠,体重(180 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号 SCXK(京)2021-0011。饲养于山西中医药大学动物房,温度(22 ± 2)℃,湿度(50 ± 5)%,自然昼夜节律,自由进水进食;实验动物使用许可证号:SYXK(晋)2020-0006。

1.2 试剂与仪器

苏木精-伊红(HE)染色液(CR2203235)、1%甲苯胺蓝染液(CR2206091)、电镜固定液(CR2211123)

均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,B 淋巴瘤 -2 (B-cell lymphoma 2, BCL-2) 基因(4000000173)、铁蛋白重链(ferritin heavy chain, FTH)(4000000023)、β-肌动蛋白(β-actin)(910026004)均购自武汉爱博泰克(ABclonal)生物科技有限公司,微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule associated protein light chain 3B, LC3B)(F074504)购自上海泊湾生物技术有限公司,天冬氨酸-胱氨酸特异性蛋白酶家族 1 P20(aspartate-cystine specific protease family-1-P20, Caspase-1-P20)(13A90②)、HRP-羊抗兔 IgG(BST15D07AE54)均购自中国博士德公司。

KDC-160HR 型台式高速冷冻离心机购自安徽中佳公司,HT7800 型透射电子显微镜、透射电子显微镜成像系统购自日本日立公司,NIKON ECLIPSE E100 正置光学显微镜、NIKON DS-U3 成像系统购自日本尼康公司,Image Quant LAS 500 型化学发光成像仪、Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件购自美国 Alpha Innotech 公司,R50 型 0 呼吸麻醉机购自中国 RWD 公司,组织研磨仪购自武汉赛维尔生物科技有限公司,自制击打仪。

1.3 动物分组和模型复制

大鼠适应性饲养 1 周后,按照随机数字表法分为空白对照组(7 只)及模型组(42 只)。模型组大鼠经 R50 型 0 呼吸麻醉机麻醉后,按照 MYCHASIUK 等^[12]提出的自由落体撞击法使用自制击打仪复制轻型颅脑损伤模型,1 次/d,持续 3 d(砝码质量:150 g,高度:1.1 m,击打部位:双耳前缘与眼后缘正中连线)。空白对照组予砝码打击以外其他刺激,放入麻醉箱麻醉,在不落下砝码的击打仪下放置一段时间,并在其彻底苏醒前对角膜和皮肤进行刺激,观察其反应。模型复制结束后,将符合下述条件大

鼠纳入各组: ①撞击后即刻出现一过性呼吸暂停, 但 ≤ 20 s; ②出现短暂的角膜反射、针刺疼痛反应消失, 但 ≤ 3 min。

1.4 动物取材及预处理

取材前禁食 12 h, 于次日 1% 戊巴比妥钠过量注射致死。空白对照组大鼠于模型复制成功 24 h 后取其中 3 只行心脏灌注, 取大鼠全脑, 放入 4% 预冷的多聚甲醛中固定 12 h, 备行 HE 染色、尼氏染色; 并取 1 只大鼠 2 mm \times 2 mm 的海马组织, 放入 2.5% 戊二醛固定液中, 4 $^{\circ}$ C 保存, 备做透射电镜; 余下 3 只在冰上分离海马, 置入 -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存备用行 Western blotting 检测。模型组分别于模型复制成功后第 1 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天各取 7 只大鼠, 各时间段取材部位、方法与空白对照组相同。

1.5 形态学及蛋白水平指标测定

1.5.1 HE 染色观察脑组织病理形态学改变 取各组大鼠海马组织固定于 4% 预冷的多聚甲醛中 12 h, 经梯度酒精脱水、二甲苯透明后, 石蜡包埋。石蜡凝固后将组织切成 5 μ m 厚的切片, 石蜡切片于 60 $^{\circ}$ C 烘箱脱蜡后, 经二甲苯浸洗、酒精梯度复水、HE 染色, 中性树胶封片, 通过正置光学显微镜成像系统采集切片图像, 每张切片选取 5 个 400 倍脑组织视野图片, 比较各组大鼠脑组织神经元损伤程度。

1.5.2 尼氏染色检测海马神经元尼氏体变化 取制好的石蜡切片, 于 60 $^{\circ}$ C 烘箱脱蜡后, 经二甲苯浸洗、酒精梯度复水、使用 1% 甲苯胺蓝溶液常温尼氏染色 15 min, 脱水, 蜡化, 中性树胶封片。正置光学显微镜下观察海马神经元尼氏体的变化, 并用 Image J 软件统计海马 CA1 区 3 张不同位置的神经元吸光度的变化。

1.5.3 铀铅双染法染色检测海马组织神经元及轴索超微结构变化 取各组大鼠 2 mm \times 2 mm 的海马组织, 放入电镜固定液中。1% 锇酸固定, 梯度乙醇脱水, 依次在环氧丙烷与 Epon812 包埋混合液、37 $^{\circ}$ C 纯 Epon812 包埋液、100 $^{\circ}$ C 包埋剂中浸泡; 后用醋酸铀染液、枸橼酸铅染液浸染; 采用 HT7800 型透射电子显微镜及成像系统观察海马组织神经元超微结构的变化。

1.5.4 Western blotting 检测海马组织 Bcl-2、LC3B、FTH、Caspase-1 蛋白的表达 取 -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存的

海马组织, 用组织研磨仪研磨, 取上清液, 使用高速冷冻离心机提取总蛋白溶液, BCA 法测定蛋白浓度, 后配蛋白上样缓冲液, 上样、电泳、转膜、封闭。分别加入 β -actin (1:30 000)、Bcl-2 一抗 (1:1 000)、LC3B 一抗 (1:2 000)、FTH 一抗 (1:1 000)、Caspase-1 一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, 滴加 HRP-羊抗兔孵育 1 h, 洗膜, 使用化学发光成像仪进行 ECL 显影, 曝光。Image Pro Plus 6.0 图像分析软件分析目的蛋白灰度值。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验或 Tamhane's *T*₂ 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马神经元病理的变化

空白对照组大鼠海马神经元 CA1 区锥体细胞数量丰富, 排列整齐紧密, 形态结构正常, 胞质核分界清晰, 染色均一。模型组第 1 天的皮层与海马体 CA1 区、CA4 区、DG 区均可见神经元皱缩, 细胞染色加深, 细胞排列不规则, 胞核胞质分界不清, 皮层皱缩神经元数量较多。模型组第 3 天的皮层与海马体 CA1、DG 区可见大量锥体细胞胞核皱缩深染, 胞核胞质分界不清。模型组第 7 天的皮层与海马体 CA1 区可见大量神经元皱缩, 细胞染色加深, 部分胞核胞质分界不清, 神经纤维排列疏松。模型组第 3 天、第 7 天的海马 CA1 区神经元数量较第 1 天减少, 锥体细胞核皱缩深染逐渐增多, 细胞排列不规则现象明显加重。模型组第 14 天神经元排列紊乱, 细胞间隙增大, DG 区有明显核固缩现象。模型组第 21 天的皮层和海马 CA1 区、DG 区有少量核固缩现象, 胞核胞质分界不清。模型组第 28 天的海马神经元锥体细胞数量较为丰富, 排列较整齐, CA1 区和 DG 区有少量核固缩现象。模型组第 14 天、第 28 天较模型组第 1 天的神经元数量明显增多, 神经元皱缩现象减少, 脑组织结构好转。见图 1。

2.2 各组大鼠海马神经元尼氏体的变化

空白对照组海马神经元尼氏体呈均匀深蓝色, 尼氏体丰富; 模型组第 1 天的 CA1 区呈淡蓝

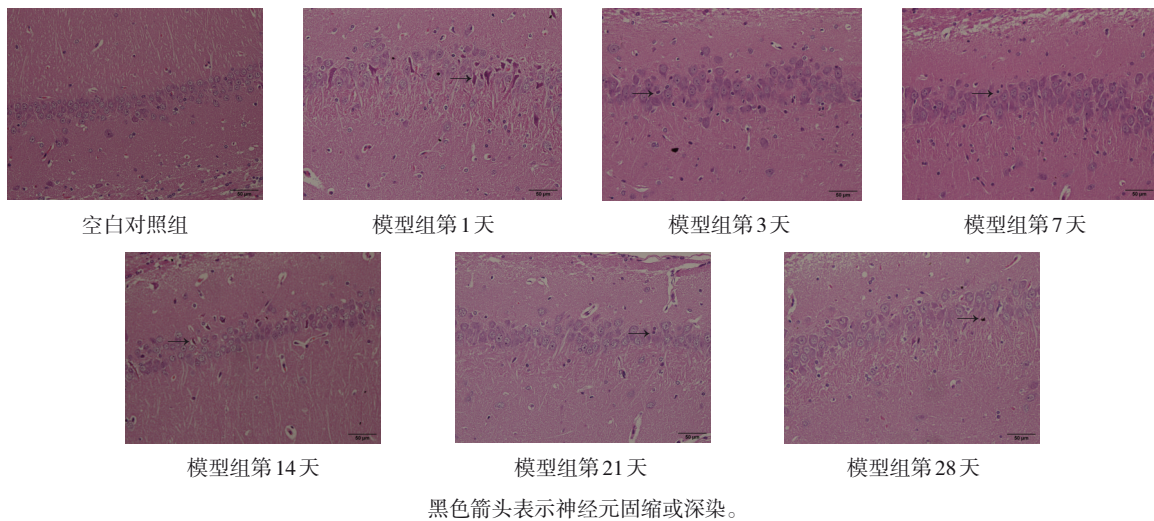


图1 各组大鼠海马神经元CA1区随时间的动态变化 (HE×400)

色,尼氏小体明显减少,椎体细胞多数核溶解消失、数量减少、间距增大、排列紊乱;模型组第3天的CA1区呈浅蓝色,尼氏小体减少,椎体细胞排列紊乱;模型组第7天的CA1区存在部分尼氏小体,细胞数量减少,排列紊乱;模型组第14天存在部分尼氏小体,部分区域核溶解消失;模型组第21天小部分尼氏体深染,小部分区域核溶解消失;模型组第28天尼氏体均匀淡蓝色,细胞数量较多,胞核胞质清晰可见。见图2。

空白对照组、模型组第1天、第3天、第7天、第14天、第21天、第28天的海马神经元尼氏小体吸光度值分别为(0.12±0.02)、(0.08±0.01)、(0.08±0.01)、(0.08±0.01)、(0.08±0.01)、(0.09±0.01)、(0.11±0.01),各组比较,经方差分析,差异

有统计学意义($F=11.570, P=0.000$)。模型组第28天与空白对照组的尼氏小体吸光度值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);其余模型组各时间段与空白对照组比较,吸光度值下降($P<0.05$),尼氏小体含量下降,颜色变浅,少量神经元发生变性、坏死。见图3。

2.3 各组大鼠海马组织神经元超微结构的变化

空白对照组神经元细胞核大而圆,染色质均匀,核膜清晰,细胞器丰富、肿胀较轻。模型组第1天的神经元细胞轻度固缩,细胞膜完整,细胞器肿胀,细胞核固缩,核周隙未见明显增宽;线粒体大多明显肿胀,基质溶解,嵴断裂、减少,空泡变;粗面内质网轻度扩张,表面核糖体较多脱颗粒,可见少量自噬溶酶体。模型组第3天的神经

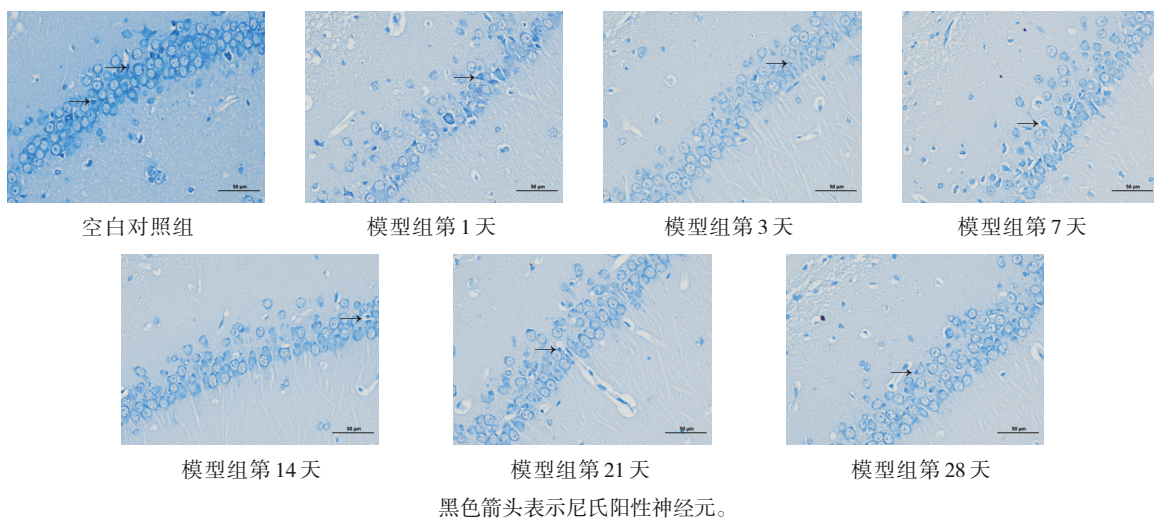
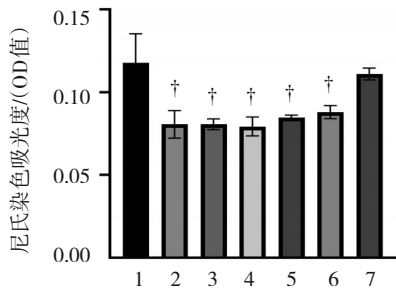


图2 各组大鼠海马神经元CA1区尼氏体的动态变化 (尼氏染色×400)



1: 空白对照组; 2: 模型组第 1 天; 3: 模型组第 3 天; 4: 模型组第 7 天; 5: 模型组第 14 天; 6: 模型组第 21 天; 7: 模型组第 28 天。
† 与模型组第 28 天比较, $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠海马神经元尼氏体的吸光度值比较

元损伤严重, 细胞膜崩解, 细胞基质局部紊乱, 细胞核核膜完整, 染色质轻度皱缩, 线粒体轻度肿胀, 基质变浅, 粗面内质网中度扩张, 可见少量自

噬溶酶体。模型组第 7 天的神经元中重度水肿, 细胞膜局部破损, 细胞核核膜完整, 染色质分布均匀, 细胞器明显肿胀, 大面积低电子密度水肿区, 细胞器明显肿胀, 基质溶解, 嵴大量断裂、缺失, 部分空泡变, 粗面内质网少量脱颗粒, 未见明显自噬; 模型组第 14 天的神经元细胞膜完整, 线粒体呈明显肿胀, 线粒体嵴大量断裂、缺失, 呈空泡变, 内质网、高尔基体未见明显肿胀, 未见明显自噬; 因模型组第 21 天样本自溶, 无法展现; 模型组第 28 天的神经元细胞呈轻度损伤, 细胞膜完整, 细胞核染色质均匀, 核仁较小, 细胞器轻度肿胀, 线粒体、粗面内质网轻度扩张, 微体个别存在, 胞内可见少量次级溶酶体和自噬溶酶体。见图 4。

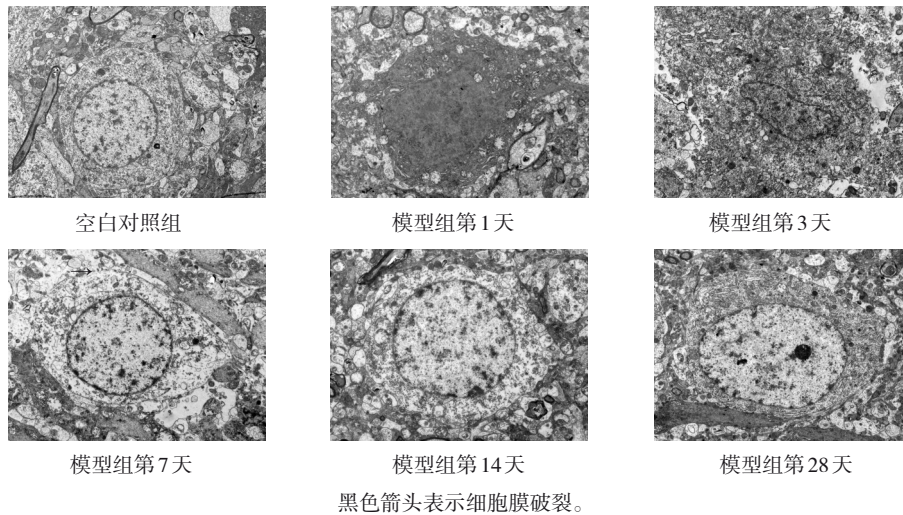


图 4 各组大鼠海马神经元超微结构的动态变化 (钡铅双染法 $\times 400$)

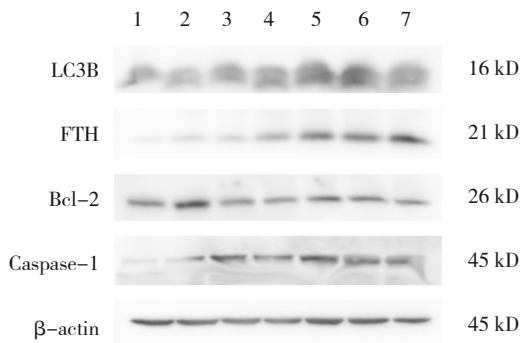
2.4 各组大鼠海马组织 Bcl-2、LC3B、FTH、Caspase-1 蛋白相对表达量比较

各组大鼠海马体 Bcl-2、LC3B、FTH、Caspase-1 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 模型组第 1 天的 Bcl-2 蛋白相对表达量显著增高 ($P < 0.05$), 模型组第 3 天、模型组第 7 天、模型组第 14 天、模型组第 21 天的 Bcl-2 蛋白相对表达量显著下降 ($P < 0.05$), 其中模型组第 3 天下降最明显; 模型组第 28 天的 Bcl-2 蛋白相对表达量与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白对照组比较, 模型组 LC3B 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), 且模型组第 21 天达到高峰, 模型组第 28 天

略有下降 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 模型组第 1 天、模型组第 3 天、模型组第 7 天、模型组第 14 天、模型组第 21 天、模型组第 28 天的 FTH 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), 且模型组第 28 天高于模型组第 21 天 ($P < 0.05$); 与空白对照组比较, 模型组第 1 天、模型组第 3 天、模型组第 7 天、模型组第 14 天、模型组第 21 天、模型组第 28 天的 Caspase-1 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$), 且模型组第 3 天达最高峰, 虽然模型组第 14 天高于模型组第 7 天 ($P < 0.05$), 但总体来讲, 72 h 后, Caspase-1 表达水平均呈下降趋势。见表 1 和图 5。

表 1 各组大鼠海马组织 Bcl-2、LC3B、FTH、Caspase-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	LC3B	FTH	Caspase-1
空白对照组	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.02
模型组第 1 天	2.57 ± 0.12	1.16 ± 0.05	1.78 ± 0.08	1.50 ± 0.06
模型组第 3 天	1.47 ± 0.05	1.36 ± 0.02	1.68 ± 0.02	2.02 ± 0.07
模型组第 7 天	1.44 ± 0.12	1.43 ± 0.06	3.31 ± 0.11	1.50 ± 0.04
模型组第 14 天	1.50 ± 0.01	2.28 ± 0.02	4.99 ± 0.01	1.94 ± 0.02
模型组第 21 天	1.40 ± 0.03	2.50 ± 0.08	5.57 ± 0.13	1.73 ± 0.05
模型组第 28 天	1.07 ± 0.02	1.89 ± 0.04	6.19 ± 0.14	1.79 ± 0.04
F 值	170.700	413.000	1 549.000	166.000
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000



1: 空白对照组; 2: 模型组第 1 天; 3: 模型组第 3 天; 4: 模型组第 7 天; 5: 模型组第 14 天; 6: 模型组第 21 天; 7: 模型组第 28 天。

图 5 各组大鼠海马组织 Bcl-2、LC3B、FTH、Caspase-1 蛋白表达

3 讨论

据报道,我国每年有 77 ~ 89 万例颅脑损伤新发病例^[2]。中枢神经系统损伤的主要生物学机制是细胞凋亡和随后的炎症过程。4 种死亡方式之间存在共同的初始激活信号及某些共同的信号通路,导致难以区分各种细胞死亡^[13],但是根据以往文献报道及本研究的结果显示,轻型颅脑损伤后细胞死亡方式会随时间发生变化。

凋亡存在于正常的神经细胞发育和生存中,是程序性细胞死亡方式的主要形式^[14],由于脑组织中有抵抗外力较强的应力纤维组织,所以神经元更易发生凋亡。有报道称,细胞凋亡在颅脑损伤后几分钟至几周内发生^[11]。本研究结果显示,模型组第 1 天的神经元细胞轻度固缩,细胞膜完整;Bcl-2 蛋白表达显著增高;这表示轻型颅脑损伤后 24 h 内是神经元凋亡的高峰期。细胞凋亡并不总是孤立存在的。

细胞凋亡的完成需要自噬参与,如果自噬受损不能清除凋亡细胞,其累积效应可能会诱导基因改变^[15]。有研究报道,在 293T 细胞凋亡期间,半胱天冬酶-3 切割焦孔素 E (GSDME),可靶向质膜诱导焦亡^[16]。研究也证实线粒体凋亡途径触发细胞内芬顿反应实现肿瘤消退^[17]。

研究表明,颅脑损伤后 3.5 h LC3 开始升高^[18]。本研究结果显示,模型组第 1 天、第 3 天、第 28 天存在自噬小体或自噬溶酶体等自噬现象,且模型组第 21 天的 LC3B 表达达到高峰;这说明自噬水平的升高在颅脑损伤中是一个连续长期的过程。自噬是生物体的一种适应性优势,允许细胞逃避多种死亡机制^[19];同时,自噬又可作为促进细胞死亡的间接原因参与到凋亡、焦亡、铁死亡中^[20-21]。自噬的功能决定了其在生物体中与其他死亡方式不可能是单线关系。如凋亡和自噬是两种互为补充的细胞进程,自噬可选择性去除促凋亡蛋白 Caspase-8 来减少细胞凋亡;Mfn1/2 摄入铁含量的动态变化可通过线粒体自噬平衡来调节^[22];自噬可通过降解刺激炎症小体产生的损伤相关分子模式 (DAMPs) 和病原体相关分子模式 (PAMPs) 来抑制焦亡。此外,在特定情况下,完全依赖于自噬途径也会导致死亡^[23]。但由于本研究没有离体实验,所以无法分清本研究自噬水平提高的结果是自噬依赖性细胞死亡,还是通过为细胞死亡复合物和信号分子提供支架来促进细胞死亡^[24],又或是促进细胞存活的适应性信号。

有文献报道,中度坐骨神经慢性压迫性损伤模型复制成功 72 h 后,在受伤的皮层中观察到线粒体体积减小,且转铁蛋白、ROS 等蛋白水平达到峰值,第 7 天恢复正常^[8]。本研究电镜结果显示,模型组第 14 天铁死亡的形态损伤更明显;而 Western blotting 结果显示,模型组第 28 天的 FTH 蛋白表达仍然在升高。铁死亡由多途径诱导发生,其中氧化应激是决定细胞命运的中轴之一^[25]。氧化应激参与众多的生理病理过程,所以铁死亡可与众多的细胞死亡方式发生关联。氧化应激是导致细胞凋亡、自噬的重要因素之一,而 Fe²⁺ 发生氧化脂质反应并产生的过量自由基 (ROS) 是驱使氧化剂与抗氧化剂不平衡进而产生氧化应激的重要诱因^[26]。有研究指出 TIMM8B 和 FN3KRP 是铁死亡与细胞凋亡共同作用靶点^[27]。铁死亡可能导致线粒体的功能紊乱和 ROS 的产生,

从而进一步激活和促进自噬的发生。反之,长时间铁离子过载可能导致功能失调的溶酶体累积、骨骼肌中游离溶酶体丧失^[28]。铁死亡与焦亡都可由氧化应激引起,高浓度的游离铁离子可以促进氧化应激,引发细胞的焦亡过程。

中枢神经系统损伤的主要生物学机制之一是神经炎症,这是治疗中枢神经系统损伤的关键切入点^[29]。细胞焦亡是一种程序性炎症性细胞死亡方式,颅脑损伤后的细胞焦亡大多集中在第 3 天或第 7 天^[30-31]。本研究结果显示,模型组第 3 天的胞膜破裂严重,Caspase-1 表达也较高,这表示轻度颅脑损伤后 72 h 内是神经元发生焦亡的高峰期,其后焦亡水平虽仍较高,但总体呈下降趋势。焦亡通常被认为是一种备用的细胞死亡机制,在凋亡通路被抑制或不可用时发挥重要作用,如半胱天冬酶/颗粒酶诱导的细胞凋亡可以由 GSDMs 的低表达而切换到焦亡^[32];此外焦亡的发展速度通常要快于凋亡,故可掩盖细胞凋亡的表型特征^[33]。自噬可以促进或抑制焦亡的发生、发展,反之,焦亡也可干扰细胞自噬反应,NLRP3 炎症小体的过度激活也会损害小胶质细胞自噬,并进一步加重神经退行性疾病^[34]。

综上所述,影响细胞选择死亡方式的因素并不是单一维度的,在不同或同种条件下引起的能源竞争会引导细胞走向不同的死亡结局。由本研究结果可知,较多神经元细胞依旧在损伤后第一时间选择凋亡,焦亡紧随其后,铁死亡较晚发生,自噬持续性进行。

参 考 文 献 :

- [1] MCDONALD M A, TAYEBI M, MCGEOWN J P, et al. A window into eye movement dysfunction following mTBI: a scoping review of magnetic resonance imaging and eye tracking findings[J]. *Brain Behav*, 2022, 12(8): e2714.
- [2] JIANG J Y, GAO G Y, FENG J F, et al. Traumatic brain injury in China[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(3): 286-295.
- [3] OKONKWO D O, PUFFER R C, PUCCIO A M, et al. Point-of-care platform blood biomarker testing of glial fibrillary acidic protein versus S100 calcium-binding protein B for prediction of traumatic brain injuries: a transforming research and clinical knowledge in traumatic brain injury study[J]. *J Neurotrauma*, 2020, 37(23): 2460-2467.
- [4] 曾子桓, 张灏, 陈伟强, 等. 颅脑损伤后继发性脑损伤发病机制的研究进展[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(12): 777-779.
- [5] WERNER C, ENGELHARD K. Pathophysiology of traumatic brain injury[J]. *Br J Anaesth*, 2007, 99(1): 4-9.
- [6] HU X L, XU Y, XU H, et al. Progress in understanding ferroptosis and its targeting for therapeutic benefits in traumatic brain and spinal cord injuries[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 705786.
- [7] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [8] XIE B S, WANG Y Q, LIN Y, et al. Inhibition of ferroptosis attenuates tissue damage and improves long-term outcomes after traumatic brain injury in mice[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(4): 465-475.
- [9] 刘源, 王蓉. 自噬相关机制在颅脑创伤中的研究进展[J]. *首都医科大学学报*, 2016, 37(6): 794-798.
- [10] TAN H J, YANG W J, WU C G, et al. Assessment of the role of intracranial hypertension and stress on hippocampal cell apoptosis and hypothalamic-pituitary dysfunction after TBI[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3805.
- [11] 谢文友, 吴玉麟, 杨燕汝, 等. TBI大鼠神经功能及凋亡基因表达的变化[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(33): 4117-4119, 4120.
- [12] MYCHASIUK R, FARRAN A, ANGOA-PEREZ M, et al. A novel model of mild traumatic brain injury for juvenile rats[J]. *J Vis Exp*, 2014(94): 51820.
- [13] JIAO Y F, CAO F Y, LIU H. Radiation-induced cell death and its mechanisms[J]. *Health Phys*, 2022, 123(5): 376-386.
- [14] FOGARTY L C, FLEMMER R T, GEIZER B A, et al. Mcl-1 and Bcl-xL are essential for survival of the developing nervous system[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(8): 1501-1515.
- [15] MILLER D R, THORBURN A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 906-918.
- [16] ROGERS C, FERNANDES-ALNEMRI T, MAYES L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14128.
- [17] CHU Q, ZHU H M, LIU B, et al. Delivery of amino acid oxidase via catalytic nanocapsules to enable effective tumor inhibition[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(37): 8546-8557.
- [18] SAKAI K, FUKUDA T, IWADATE K. Immunohistochemical analysis of the ubiquitin proteasome system and autophagy lysosome system induced after traumatic intracranial injury: association with time between the injury and death[J]. *Am J Forensic Med Pathol*, 2014, 35(1): 38-44.
- [19] LOZY F, KARANTZA V. Autophagy and cancer cell metabolism[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(4): 395-401.
- [20] YOUNG M M, TAKAHASHI Y, KHAN O, et al. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15): 12455-12468.
- [21] WANG Y, LIAO S, PAN Z H, et al. Hydrogen sulfide alleviates particulate matter-induced emphysema and airway inflammation

- by suppressing ferroptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 186: 1-16.
- [22] ZHENG Q Q, ZHAO Y S, GUO J, et al. Iron overload promotes mitochondrial fragmentation in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients through activation of the AMPK/MFF/Drp1 pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 515.
- [23] DASARI S K, BIALIK S, LEVIN-ZAIDMAN S, et al. Signalome-wide RNAi screen identifies GBA1 as a positive mediator of autophagic cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(7): 1288-1302.
- [24] CAO K, TAIT S W G. Apoptosis and cancer: force awakens, phantom menace, or both?[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 337: 135-152.
- [25] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [26] 罗春, 步世忠, 王福艳. 葛根素治疗 2 型糖尿病的药理机制和临床进展[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(11): 1582-1585.
- [27] 高金玲. 纳米氧化铁颗粒引起细胞铁代谢紊乱及铁死亡通路激活机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [28] JAHNG J W S, ALSAADI R M, PALANIVEL R, et al. Iron overload inhibits late stage autophagic flux leading to insulin resistance[J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(10): e47911.
- [29] HU X L, ZHANG H J, ZHANG Q X, et al. Emerging role of STING signalling in CNS injury: inflammation, autophagy, necroptosis, ferroptosis and pyroptosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 242.
- [30] CAO Y Y, SHI M M, LIU L, et al. Inhibition of neutrophil extracellular trap formation attenuates NLRP1-dependent neuronal pyroptosis via STING/IRE1 α pathway after traumatic brain injury in mice[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1125759.
- [31] 齐曼曼, 王旭鹏, 李妍, 等. STING-Caspase-1 信号通路对创伤性颅脑损伤大鼠认知功能障碍的作用[J]. *新医学*, 2021, 52(5): 347-351.
- [32] TSUCHIYA K. Switching from apoptosis to pyroptosis: gasdermin-elicited inflammation and antitumor immunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 426.
- [33] PURI A W, BROZ P, SHEN A, et al. Caspase-1 activity is required to bypass macrophage apoptosis upon Salmonella infection[J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(9): 745-747.
- [34] WU A G, ZHOU X G, QIAO G, et al. Targeting microglial autophagic degradation in NLRP3 inflammasome-mediated neurodegenerative diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65: 101202.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 王恬恬, 赵乐, 冯忆, 等. 4 种程序性细胞死亡方式在轻型颅脑损伤中的发展探究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(13): 49-56.

Cite this article as: WANG T T, ZHAO L, FENG Y, et al. Exploration of development of four programmed cell death modes in mild traumatic brain injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(13): 49-56.