

肿瘤内科学专题

· 基础研究 ·

## Caspase-1 信号通路介导的细胞焦亡在放射性肠炎中的作用\*

李静, 吴东明, 喻叶, 王越峰, 许颖<sup>△</sup>

610500 成都, 成都医学院第一附属医院 检验科

**[摘要]** 目的:探讨胱天蛋白酶 1 (Caspase-1) 信号通路介导的细胞焦亡在放射性肠炎中的作用。方法:X 射线随机辐射处理 5 只小鼠建立放射性肠炎模型,另取 5 只未处理小鼠为对照组。将体外培养的正常人肠上皮细胞分为对照组、电离辐射 (ionizing radiation, IR) 组和 Caspase-1 特异性抑制剂 (Z-YVAD-FMK, YVAD) + IR 组。YVAD + IR 组用 YVAD 处理后辐射。采用 HE 染色观察肠组织病理学改变。实时荧光定量 PCR 检测细胞及肠组织中白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、IL-18 的 mRNA 表达。ELISA 法检测小鼠血清及细胞培养基中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的含量水平。免疫组化检测肠组织中含 pyrin 结构域 NOD 样受体家族 3 (NOP-like receptor family, Pyrin domain containing 3, NLRP3)、Caspase-1 和含 CARD 结构域凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 的表达情况。蛋白质印迹分析法检测 Caspase-1-p20、gasdermin D 的 N 末端 (GSDMD-N)、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达。Caspase-1 活性检测试剂盒检测 Caspase-1 活性。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒检测培养基中 LDH 释放量。细胞活力测定检测细胞活性。结果:辐射后小鼠肠组织隐窝结构丧失,绒毛萎缩;IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达增加 ( $P < 0.01$ );NLRP3、Caspase-1、ASC、Caspase-1-p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达增加;血清 IL-1 $\beta$  和 IL-18 含量增加 ( $P < 0.01$ );Caspase-1 活性增强 ( $P < 0.01$ )。细胞水平上,与 IR 组相比,YVAD + IR 组中 Caspase-1、Caspase-1-p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达水平降低;Caspase-1 活性降低 ( $P < 0.01$ );IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 的 mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ );培养基中 IL-1 $\beta$  和 IL-18 含量降低 ( $P < 0.01$ );LDH 的释放水平降低 ( $P < 0.01$ );细胞活性增强 ( $P < 0.01$ )。结论:放射性肠炎主要表现为炎性损伤,其机制可能与肠组织中 NLRP3 炎性小体诱导的 Caspase-1 依赖性细胞焦亡的参与相关。

**[关键词]** 放射性肠炎;细胞焦亡;炎性小体;Caspase-1

**[中图分类号]** R818.74;R730.55 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.09.003

**引文格式:** Li J, Wu DM, Yu Y, et al. Role of Caspase-1 signaling pathway-mediated pyroptosis in radiation enteritis [J]. J Cancer Control Treat, 2019,32(9):756-763. [李静, 吴东明, 喻叶, 等. Caspase-1 信号通路介导的细胞焦亡在放射性肠炎中的作用 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2019,32(9):756-763.]

## Role of Caspase-1 Signaling Pathway-Mediated Pyroptosis in Radiation Enteritis

Li Jing, Wu Dongming, Yu Ye, Wang Yuefeng, Xu Ying

Laboratory Department, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan, China

Corresponding author: Xu Ying, E-mail: yingxu825@126.com

This study was supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (NO. 81972977) and National Natural Science Foundation of China (Youth Scientist Fund) (NO. 81001345, NO. 81802955).

**[收稿日期]** 2019-05-09 **[修回日期]** 2019-08-01

**[基金项目]** \* 国家自然科学基金面上项目 (编号:81972977); 国家自然科学基金青年项目 (编号:81001345,81802955)

**[通讯作者]** <sup>△</sup>许颖, E-mail: yingxu825@126.com

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of caspase-1 signaling pathway-mediated pyroptosis in radiation enteritis. **Methods:** Five mice were randomly treated with X-ray to es-

establish a model of radiation enteritis, and another five untreated mice were used as the control group. Normal human intestinal epithelial cells (HIEC) cultured in vitro were treated with Caspase-1 specific inhibitor (Z-YVAD-FMK, YVAD) and irradiated. HIEC were assigned to the control group, the ionizing radiation (IR) group and the YVAD + IR group. Pathological changes in intestinal tissue were observed by using hematoxylin and eosin staining. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 in cells and intestinal tissue. Levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum and culture medium were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay. Immunohistochemistry was used to detect the expression of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), Caspase-1 and apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in intestinal tissue. The expression of Caspase1-p20, GSDMD-N, IL-1 $\beta$  and IL-18 protein was detected by Western blotting. Caspase-1 activity assay kit was used to detect the Caspase-1 activity. Lactate dehydrogenase (LDH) assay kit was used to detect the amount of LDH released from the culture medium. Cell viability was measured by cell counting kit-8 assay. **Results:** After radiation, the structure of intestinal crypts of mice was lost, and the villus was atrophied; the mRNA expression of IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) increased ( $P < 0.01$ ); expression of NLRP3, Caspase-1, ASC, Caspase1-p20, GSDMD-N IL-1 $\beta$ , IL-18 increased; serum IL-1 $\beta$  and IL-18 levels increased ( $P < 0.01$ ); Caspase-1 activity increased ( $P < 0.01$ ). Compared to the IR group, the expression of Caspase-1, Caspase1-p20, GSDMD-N, IL-1 $\beta$  and IL-18, the Caspase-1 activity level, the mRNA expression of IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, the IL-1 $\beta$  and IL-18 levels in culture medium and the release of LDH were lower ( $P < 0.01$ ) while the cell activity level was higher in the YVAD + IR group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Radiation enteritis mainly manifests as inflammatory injury, and its mechanism may be related to the effect of NLRP3 inflammasome-induced Caspase-1 dependent pyroptosis in intestinal tissue.

[Key words] Radiation enteritis; Pyroptosis; Inflammasome; Caspase-1

腹盆腔恶性肿瘤是发生率最高的恶性肿瘤之一,放射疗法在腹盆腔恶性肿瘤患者治愈和姑息治疗中扮演重要角色<sup>[1]</sup>。尽管随着放射物理学和技术的发展,放疗在“物理精准”上已经取得了很大进步,但“物理精准”方法仍然无法彻底解决辐射对正常组织毒性作用的问题<sup>[2]</sup>。在放射治疗腹内或盆腔恶性肿瘤时,辐射场不可避免地会包括健康肠道,引发不良后果,随后表现为辐射诱导的肠损伤<sup>[3]</sup>。据报道,接受腹内或盆部放疗后的患者,约 60% ~ 80% 会出现急性消化道不适症状,其中,约 50% 的患者会出现不同程度的慢性肠功能障碍<sup>[3]</sup>。放射性肠损伤过程复杂,发生机制尚不明确。近年来,越来越多的证据表明炎症在放射性肠损伤中起重要作用<sup>[3,4]</sup>。细胞焦亡是近年来新发现的一种依赖半胱天冬酶活化的促炎程序性细胞死亡方式,以细胞肿胀裂解并伴随大量促炎因子释放为主要表现形式<sup>[5]</sup>,但胱天蛋白酶 1 (cysteiny aspartate specific protease 1, Caspase-1) 介导的细胞焦亡是否参与放射性肠炎的发生发展,至今尚少见相关报道。因此,本研究拟结合动物和细胞水平探讨 Caspase-1 信号通路介导的细胞焦亡在放射性肠炎中的作用,为开发预防或缓解性治疗提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

6 ~ 8 周龄,雌性 BALB/c 小鼠,体重(18 ± 2)g,

购于达硕动物科技有限公司,动物饲养严格遵守实验标准进行。正常人肠上皮细胞株(normal human intestinal epithelial cells, HIEC)为本课题组保存。gasdermin D 的 N 末端(GSDMD-N)、含 pyrin 结构域核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族 3 [nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor family, pyrin domain containing 3, NLRP3] 抗体、胱天蛋白酶 1 特异性抑制剂(Z-YVAD-FMK, YVAD) 购自 Abcam 公司。Caspase1、含 CARD 结构域凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、白细胞介素 18(interleukin-18, IL-18)、IL-1 $\beta$ 、Caspase1-p20 抗体购自 CST 公司。GAPDH 抗体,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG 购自 Proteintech 公司。Caspase-1 活性检测试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 释放检测试剂盒、CCK-8 试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。免疫组化试剂盒及二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB) 显色液购于北京中杉金桥。本实验所用细胞 96 孔板、六孔板、培养皿均购于 Corning 公司。MEM 培养基、0.25% 胰酶购于 hyclone 公司,胎牛血清、青-链霉素购于 Gbico 公司。RNA 提取试剂盒购于北京索莱宝生物公司。逆转录及扩增试剂盒购于 BIO-RAD 公司。ELISA 试剂盒购自贝塞维斯(深圳)生物科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标本收集及处理 随机将 10 只健康小鼠分为对照组 (n = 5) 和辐射组 (n = 5)。辐射组小鼠经麻醉后仰卧固定,腹部辐射野 30mm × 50mm, X 线一次性辐射 15Gy<sup>[6]</sup>, 对照组麻醉后不做处理。辐射 7d 后,取对照组和辐射组血清用于 ELISA 检测,然后断颈处死,迅速切开腹腔取小鼠小肠,取部分置于 100g/L 甲醛溶液中固定,部分存放于 -80℃。

1.2.2 细胞培养和处理 将复苏的 HIEC 细胞用含有 15% 的 FBS, 100μg/mL 链霉素和 100U/mL 青霉素的 MEM 培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞达到 70%~80% 汇合时,分为对照组、电离辐射 (ionizing radiation, IR) 组和 YVAD + IR 组。IR 组采用 X 线一次性辐照 15Gy, YVAD + IR 组用 YVAD (100μM) 处理后<sup>[7]</sup>, X 线一次性辐照 15Gy<sup>[6]</sup>,辐照后继续培养 24h 用于后续实验。

1.2.3 细胞活力测定 取对数生长期的细胞以 5 000 个细胞/孔接种到 96 孔培养板上,每组设置 6 个复孔,培养过夜。处理后 24h,根据制造商说明书检测细胞活力。重复实验 3 次。

1.2.4 Caspase-1 活性分析 将达到 70%~80% 汇合的细胞分为对照组、IR 组和 YVAD + IR 组。IR 组采用 X 线一次性辐照 15Gy; YVAD + IR 组用 YVAD (100μM) 处理后<sup>[7]</sup>, X 线一次性辐照 15Gy<sup>[6]</sup>,辐照后继续培养 24h,收集细胞。辐射处理小鼠后,收集对照及辐射组小鼠肠组织,根据制造商说明书检测 Caspase-1 活性。重复实验 3 次。

1.2.5 LDH 释放测定 将对数生长期的细胞以 5 000 个细胞/孔接种到 96 孔培养板,每组设置 3 个重复孔,培养过夜。处理后 24h,收集细胞培养液。根据制造商说明书检测 LDH 水平。重复实验 3 次。

1.2.6 ELISA 检测 IL-1β、IL-18 含量 将对数生长期的细胞以 5 000 个细胞/孔接种到 96 孔培养板,每组设置 3 个重复孔,培养过夜,处理后 24h,收集细胞培养液。辐射处理小鼠后,收集对照及辐射组小鼠血清,根据制造商说明书检测 IL-1β、IL-18 含量。重复实验 3 次。

1.2.7 蛋白质印迹分析 使用 RIPA 裂解液裂解处理后的小鼠肠组织与细胞,使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定总蛋白质含量水平,随后进行 SDS-PAGE 电泳,将凝胶中蛋白质转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1h,将膜与一抗 4℃ 摇床孵育过夜。次日用 TBST 洗 10min × 3 次,然后二抗室温孵育 2h, TBST 洗 10min × 3 次,显影、成像。重复实

验 3 次。

1.2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肠组织和 HIEC 中 IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β、IL-18 的 mRNA 水平,引物由上海生工生物公司合成 (表 1、2)。参照 RNA 提取试剂盒说明书提取各组 RNA,用 BIO-RAD 逆转录试剂盒进行逆转录,分别将 2μg 的总 RNA 逆转录为 cDNA,操作按照试剂盒说明书进行。利用 BIO-RAD 的 SYBR-Green PCR Mix 试剂盒检测 mRNA 表达水平,按照试剂盒说明书进行操作。重复实验 3 次。

表 1 小鼠基因 PCR 引物

Table 1. PCR Primer of Mouse Genes

Gene (mouse)	Primer	Sequence length (bp)
IL-1β	Forward 5'-TGAAATGCCACCTTTTGA CAGTGAT-3'	120
	Reverse 5'-AGCTGGATGCTCTCATCA GGA-3'	
IL-18	Forward 5'-ACTTTGGCCGACTTCACT GT-3'	125
	Reverse 5'-GGGTTCACTGGCACTTTG AT-3'	
β-actin	Forward 5'-GGGTTCACTGGCACTTTG AT-3'	174
	Reverse 5'-ATGCCACAGATTCCAT ACC-3	
IL-6	Forward 5'-GGGAAATCGTGAAATG AGA-3'	131
	Reverse 5'-TCCAGTTTGTTAGCATCC ATC-3'	
IL-8	Forward 5'-CTAGGCATCTTCGTCCCGT CC-3'	200
	Reverse 5'-TTCACCCATGGAGCATCA GG-3'	
TGF-α	Forward 5'-GCCAACGGCATGGATCTC AA-3'	181
	Reverse 5'-TCTTGACGGCAGAGAGGA GG-3'	

TGF-α: Transforming growth factor alpha.

表 2 人源基因 PCR 引物

Table 2. PCR Primer of Human Genes

Gene (automatic)	Primer	Sequence length (bp)
IL-1β	Forward 5'-GCGGCATCCAGCTACGAATC TC-3'	101
	Reverse 5'-AACCAGCATCTTCTCAGCT TGTC-3'	
IL-18	Forward 5'-TGGCTGCTGAACCCAGTAGA AG-3'	180
	Reverse 5'-GAGGCCGATTTCTTGGTCA-3'	
β-actin	Forward 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	144
	Reverse 5'-GGGCCGACTCGTCATAC-3	
IL-6	Forward 5'-TTCAATGAGGAGACTTGCCT- GGTG-3'	127
	Reverse 5'-TTGTACTCATCTGCACAGCTC TGG-3'	

(Table 2 continues on next page)

(Continued from previous page)

Gene (automatic)	Primer	Sequence length (bp)
IL-8	Forward 5'-GGACCACACTGCGCCAACAC-3'	93
	Reverse 5'-AACCTCTGCACCCAGTTTTTC-3'	
TGF- $\alpha$	Forward 5'-AGCTGGTGGTCCATCAGAG-3'	124
	Reverse 5'-TGGTAGGAGACGGCGATGCG-3'	

TGF- $\alpha$ : Transforming growth factor alpha.

1.2.9 免疫组织化学染色 将对照组和辐射组小鼠肠组织石蜡包埋、切片,脱蜡、水化,用柠檬酸缓冲液高压 10 分钟修复抗原,待自然冷却,30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温避光封闭 15min, PBS 洗涤 5min  $\times$  3 次,山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30min, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育 NLRP3 抗体、Caspase-1 抗体、ASC 抗体。次日, PBS 洗涤 5min  $\times$  3 次, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 生物素化山羊抗兔 IgG, PBS 洗涤 5min  $\times$  3 次, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 辣根过氧化物酶标记链亲和素, PBS 洗涤 5min  $\times$  3 次, DAB 显色, 流水冲

洗 15min, 复染苏木素 1min 后, 流水冲洗 30min, 待返蓝色后, 脱水封片, 于显微镜下观察采集图像。

1.2.10 HE 染色 将对照组和辐射组小鼠肠组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 根据凯基生物 HE 染色试剂盒说明书进行染色, 于显微镜下观察采集图像。

1.2.11 统计分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件对实验结果进行统计分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 两组间比较采用 *t* 检验, 多组之间采用方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 辐射引起肠组织形态改变

由 HE 染色结果可见: 与对照组小鼠相比, 辐射组小鼠肠组织隐窝结构破坏, 炎性细胞浸润, 绒毛萎缩 (图 1)。

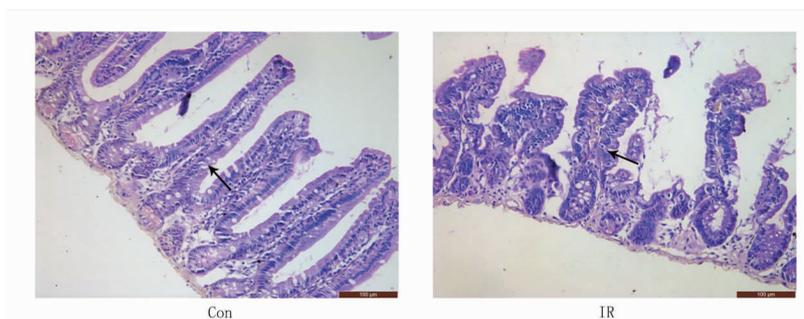


图 1 小鼠肠组织病变情况 (HE 染色,  $\times 200$ )

Figure 1. Intestinal Tissue Lesions in Mice (HE Staining,  $\times 200$ )

Con: The control group; IR: The ionizing radiation group.

2.2 辐射引起肠组织炎性因子的 mRNA 水平增加 与对照组小鼠相比, qRT-PCR 检测结果发现, 辐射组小鼠中 IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18、IL-1 $\beta$  的

mRNA 水平增高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ , 图 2)。

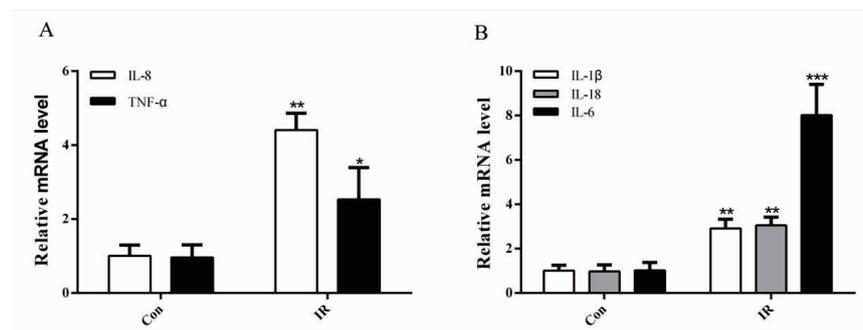


图 2 辐射引起肠组织炎性因子的 mRNA 水平增加

Figure 2. An Increase in the mRNA Level of Intestinal Inflammatory Factors Caused by Irradiation

Panel A and B show the mRNA levels of IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 and IL-6 in two groups detected by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ . Con: The control group; IR: The ionizing radiation group.

### 2.3 辐射引起 NLRP3 激活并诱导肠组织发生细胞焦亡

免疫组化结果显示:与对照组小鼠相比,辐射引起 NLRP3、Caspase-1、ASC 在辐射组小鼠肠组织中表达增强(图 3A)。蛋白质印迹结果显示,与对照组小鼠相比,辐射组小鼠肠组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18、

Casp1-p20、GSDMD-N 表达增强(图 3B)。ELISA 实验结果显示,与对照组小鼠相比,辐射组小鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 3C)。Caspase-1 活性检测试验发现,辐射组小鼠肠组织中 Caspase-1 活性明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,图 3D)。

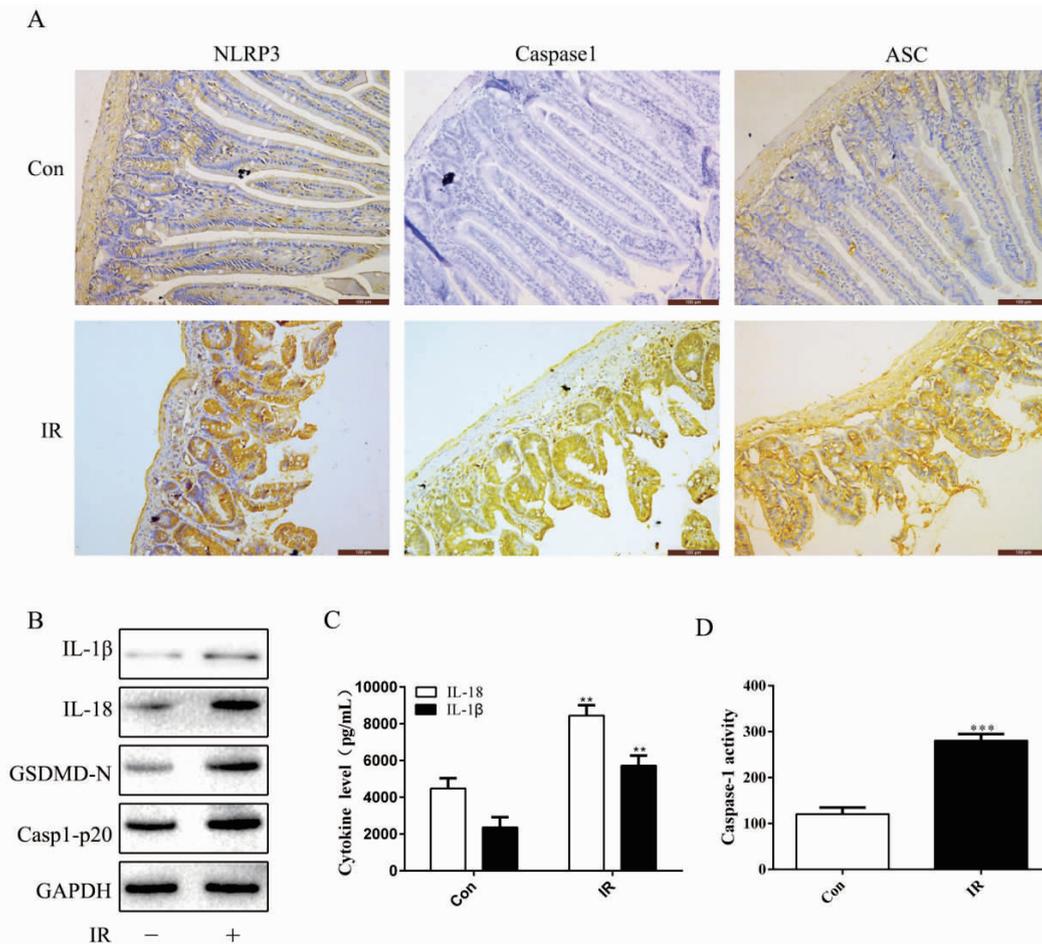


图 3 辐照引起 NLRP3 激活并诱导肠组织发生细胞焦亡

Figure 3. NLRP3 Activated and Intestinal Tissue Pyroptosis Induced by Irradiation

Panel A shows the expression of NLRP3, Caspase-1, ASC in mouse intestinal tissue (immunohistochemical staining,  $\times 200$ ); Panel B shows the detection of IL-1 $\beta$ , IL-18, GSDMD-N in mouse intestinal tissue detected by Western blotting, and N-terminal, Casp1-p20 protein level; Figure C shows the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in serum of mice determined by enzyme-linked immunosorbent assay; Figure D shows the activity of Caspase-1 in mouse intestinal tissue. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ . Con: The control group; IR: The ionizing radiation group.

### 2.4 YVAD 抑制辐射性细胞焦亡的发生

蛋白质印迹结果发现,与 IR 组细胞相比,IR + YVAD 组细胞中 Caspase-1、casp1-p20、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达降低(图 4A);Caspase-1 活性检测试验显示 IR + YVAD 组细胞中 Caspase-1 活性明显低于 IR 组细胞,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 4B);ELISA 实验结果显示,与 IR 组细胞培养液相比,IR + YVAD 组细胞培养液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量明显降低,差异有统计学意义( $P <$

$0.01$ ,图 4C - D)。

### 2.5 YVAD 减轻放射性炎症损伤

与 IR 组细胞相比,qRT-PCR 检测结果发现 IR + YVAD 组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-18、IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$  的 mRNA 水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 5A - E)。LDH 释放检测与 CCK-8 活性检测实验发现,与 IR 组细胞相比,IR + YVAD 组细胞中 LDH 释放水平明显降低,细胞活性明显增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 5F - G)。

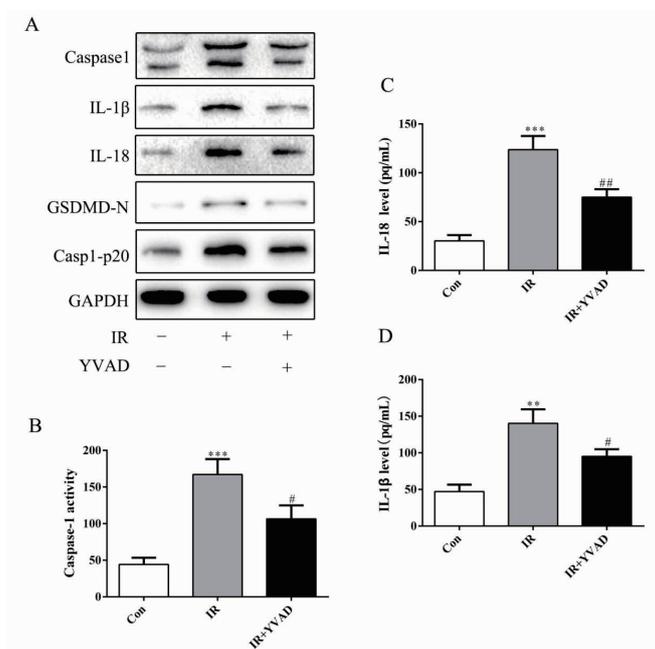


图 4 YVAD 抑制放射性细胞焦亡的发生

Figure 4. Occurrence of Radiation-Induced Pyroptosis Inhibited by YVAD

Panel A shows the levels of Caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-18, GSDMD-N, and Casp1-p20 protein in each group of cells detected by Western blotting; Panel B shows the activity of Caspase-1 in each group of cells; Panel C and D show the levels of IL-1 $\beta$  and IL-18 in the culture medium of each group determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The IR group and the control group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ; the IR + YVAD group and the IR group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ . Con: The control group; IR: The ionizing radiation group.

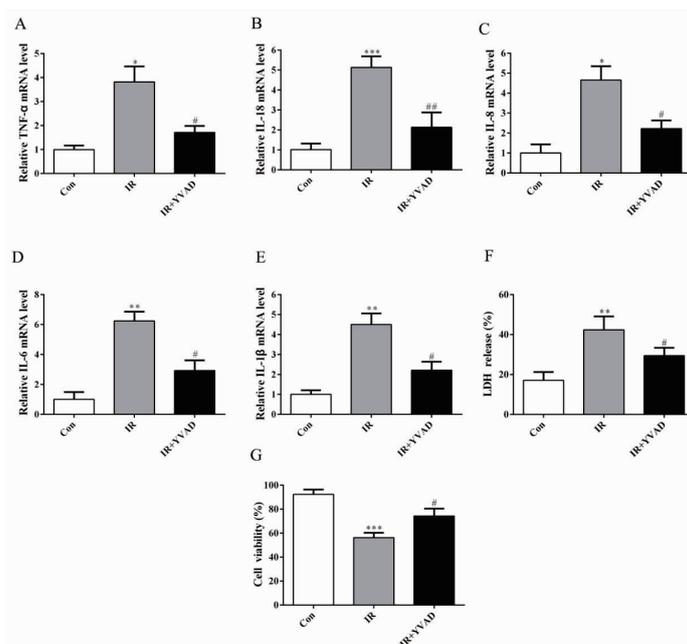


图 5 YVAD 减轻放射性炎症损伤

Figure 5. Radiation Inflammatory Injury Reduced by YVAD

Panel A, B, C, D, E, F, and G show the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-18, IL-8, IL-6, and IL-1 $\beta$  in each group detected by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. Panel F shows the release of LDH in each group. Panel G shows the activity level of cells in each group measured by cell counting kit-8 assay. The IR group and the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 3$ ; the IR + YVAD group and the IR group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ,  $n = 3$ . Con: The control group; IR: The ionizing radiation group.

### 3 讨论

放疗是腹盆腔恶性肿瘤患者治疗的重要组成部分,对于原发、复发或转移病灶均有确切疗效<sup>[1]</sup>。然而,放疗在损伤肿瘤细胞的同时,不可避免会损害机体正常细胞,进而引发多种并发症<sup>[8-9]</sup>。据报道,世界上每年接受腹、盆部放疗的肿瘤患者高达 50 万,其中约 70%~80% 的患者会出现急性肠道症状,严重影响患者治疗进展和生存质量<sup>[3,10-11]</sup>。因此,迫切需要更好地理解放射性肠损伤的疾病机制,以便为寻求新的治疗、预防方法提供新的见解。

RE 是腹部或盆腔照射后的一种常见并发症,可发生于任何节段肠道,约有 5%~17% 的发生率<sup>[3,11]</sup>。有研究发现 RE 本质上是一种炎症,在放射性肠损伤过程中有多个炎性相关基因被上调,并通过不断募集炎症细胞,导致细胞内或细胞间炎症反应被不断放大<sup>[12-14]</sup>。本研究通过 X 射线一次性照射小鼠腹部 15Gy 模拟放射性肠损伤,实验结果显示,辐射组小鼠肠组织中炎性细胞浸润明显,IL-6 等炎性因子的 mRNA 水平明显升高。这些结果,提示辐射导致的放射性肠损伤的主要表现为炎性损伤,RE 动物模型构建成功<sup>[5]</sup>。

细胞焦亡是近期发现的一种高度依赖于 Caspase-1 活化的促炎程序性细胞死亡方式<sup>[15-16]</sup>。多项研究发现,NLRP3 炎性小体诱导的细胞焦亡与痛风、阿尔茨海默病等多种炎症相关疾病的进展关系密切<sup>[17-20]</sup>。因此,我们进一步检测细胞焦亡相关标志物在肠组织中的表达,探讨 RE 的炎性反应过程是否有 NLRP3 炎性小体诱导的 Caspase-1 依赖性细胞焦亡参与。实验结果发现,辐射组小鼠肠组织中 NLRP3 炎性小体与 GSDMD-N、Caspase-1-p20 等焦亡标志蛋白表达明显增加;Caspase-1 活性增强;且辐射组小鼠血清中的 IL-18、IL-1 $\beta$  含量水平均高于未照射的正常小鼠,提示 NLRP3 炎性小体诱导的 Caspase-1 依赖性细胞焦亡可能参与放射性肠损伤的发生、发展过程。

由于细胞焦亡是一种炎症性细胞死亡方式,它有通过释放炎性因子促进清除病原体的作用,但也有研究表明,发生肿胀破裂的焦亡细胞,继而会释放内容物引发级联放大的炎症反应,可能会加重疾病进展<sup>[21-22]</sup>。为了进一步明确 Caspase-1 信号通路介导的细胞焦亡在 RE 中的作用,我们进行了体外细胞相关实验。实验结果发现,IR + YVAD 组细胞中的焦亡水平、IL-6 等炎性因子的 mRNA 水平及 LDH

释放水平明显低于 IR 组细胞,细胞活力明显高于 IR 组细胞,提示抑制细胞焦亡的发生可以减弱辐射诱导的炎性反应,从而减轻放射性损伤。

综上,本实验成功建立了 RE 动物模型,并检测了辐射后肠组织中 NLRP3 炎性小体的激活情况及 Caspase-1-p20 等焦亡相关指标,得出 NLRP3 诱导的 Caspase-1 依赖性细胞焦亡参与了 RE 的发病。接着我们通过体外细胞实验,检测 YVAD 处理后辐射的焦亡水平及炎性损伤情况,得出 Caspase-1 信号通路介导的细胞焦亡可能在 RE 发生发展中具有一定的致病作用。本研究结果为揭示 RE 这一复杂疾病的发病机制及寻求有效途径预防治疗提供了一定的理论基础。但 NLRP3 炎性小体是被怎样的途径激活及如何抑制细胞焦亡的具体下游成分来达到治疗 RE 的目的,仍需进一步的研究。

**作者声明:**本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

**学术不端:**本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

**同行评议:**经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

**利益冲突:**所有作者均声明不存在利益冲突。

**文章版权:**本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

#### [参考文献]

- [1] Nicholas S, Chen L, Choflet A, et al. Pelvic radiation and normal tissue toxicity[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2017, 27(4): 358-369.
- [2] 谭明宇, 冯梅, 黄建鸣, 等. 基于 DNA 损伤反应基因的肿瘤放射治疗剂量分割模式的研究进展[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2018, 31(5): 71-75.
- [3] Hauer-Jensen M, Denham JW, Andreyev HJ. Radiation enteropathy-pathogenesis, treatment and prevention[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11(8): 470-479.
- [4] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254.
- [5] Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, et al. Neuronal cell death[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(2): 813-880.
- [6] Dubois H, Sorgeloos F, Sarvestani ST, et al. Nlrp3 inflammasome activation and Gasdermin D-driven pyroptosis are immunopathogenic upon gastrointestinal norovirus infection[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4): e1007709.

- [7] Leeman JE, Schoenfeld JD. Radiation therapy and immune modulation[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2019, 33(2): 233-248.
- [8] Wang JT, Xie WQ, Liu FQ, et al. NADH protect against radiation enteritis by enhancing autophagy and inhibiting inflammation through PI3K/AKT pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(6): 1713-1721.
- [9] Joyce M, Thirion P, Kiernan F, et al. Laparoscopic pelvic sling placement facilitates optimum therapeutic radiotherapy delivery in the management of pelvic malignancy[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2009, 35(4): 348-351.
- [10] Toullec A, Buard V, Rannou E, et al. HIF-1 $\alpha$  deletion in the endothelium, but not in the epithelium, protects from radiation-induced enteritis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(1): 15-30.
- [11] Song S, Chen D, Ma T, et al. Molecular mechanism of acute radiation enteritis revealed using proteomics and biological signaling network analysis in rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(11): 2704-2713.
- [12] Huang Y, Guo F, Yao D, et al. Surgery for chronic radiation enteritis: outcome and risk factors[J]. *J Surg Res*, 2016, 204(2): 335-343.
- [13] Chen Q, Xia X, Wu S, et al. Apoptosis, necrosis, and autophagy in mouse intestinal damage after 15-Gy whole body irradiation[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8): 647-656.
- [14] Tang D, Kang R, Berghe TV, et al. The molecular machinery of regulated cell death[J]. *Cell Res*, 2019, 29(5): 347-364.
- [15] Jorgensen I, Zhang Y, Krantz BA, et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis[J]. *J Exp Med*, 2016, 213(10): 2113-2128.
- [16] Gong T, Yang Y, Jin T, et al. Orchestration of nLRP3 inflammasome activation by ion Fluxes[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(5): 393-406.
- [17] Ramos-Guzmán CA, Zinovjev K, Tuñón I. Modeling caspase-1 inhibition: Implications for catalytic mechanism and drug design[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 169(5): 159-167.
- [18] Ma Y, Jiang J, Gao Y, et al. Research progress of the relationship between pyroptosis and disease[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(7): 2213-2219.
- [19] Zeng C, Wang R, Tan H. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7): 1345-1357.
- [20] Evavold CL, Kagan JC. Defying death: The (W) hole truth about the fate of GSDMD pores[J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 15-17.
- [21] Dubois H, Sorgeloos F, Sarvestani ST, et al. Nlrp3 inflammasome activation and Gasdermin D-driven pyroptosis are immunopathogenic upon gastrointestinal norovirus infection[J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4): e1007709.
- [22] Beier JI, Banales JM. Pyroptosis: An inflammatory link between NAFLD and NASH with potential therapeutic implications[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 643-645.