DOI:10.16016/j.2097-0927.202401084

Senp1 介导蛛网膜下腔出血后神经元焦亡的作用

马寅瑞,何朝晖 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科

[摘要] **目的** 探究 SUMO 特异性蛋白酶 1(SUMO-specific protease 1,Senp1)在蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)中参与神经元焦亡的机制。**方法** 95 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为假手术(sham)组(n=15)、SAH(6、12、24、48、72 h)组(n=8、7、17、6、6)、SAH+AAV9-NC 组(n=19)、SAH+AAV9-sh-Senp1 组(n=17),左侧颈内动脉血管内穿刺建立 SAH 动物模型,神经行为学评分评价神经功能,HE 染色、FJC 染色观察脑皮质神经元损伤情况,RT-PCR 检测敲低 Senp1 的 mRNA 水平,Western blot 检测各组 Senp1、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、焦孔素 D(gasdermin D,GSDMD)、含 PYD 和 CARD 域蛋白(PYD and CARD domain containing,ASC)及半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)的表达,免疫荧光观察 Senp1 和 NLRP3 的定位表达。**结果** SAH 后 Senp1 表达升高,于 24 h 达到峰值,并表达于脑皮质神经元。与 sham 组相比,SAH 组 Senp1、NLRP3、GSDMD、ASC 和 Caspase-1 的表达明显升高(P<0.01),神经损伤加重,并且有神经功能障碍;与 SAH+AAV9-NC 组相比,给予 AAV9-sh-Senp1 后神经损伤及功能明显改善,Senp1 及上述焦亡蛋白 NLRP3、GSDMD、ASC、Caspase-1 表达明显降低(P<0.01),抑制了 NLRP3 介导的神经元焦亡。**结论** Senp1 在 SAH 后促进细胞焦亡的发生,介导神经元损伤。

[关键词] Senp1;蛛网膜下腔出血;细胞焦亡;神经炎症

[中图法分类号]R345; R363.21; R743.35 [文献标志码] A

Senp1 mediates neuronal pyroptosis after subarachnoid hemorrhage in mice

MA Yinrui, HE Zhaohui Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of SUMO-specific protease 1 (Senp1) involved in neuronal pyroptosis in subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** A total of 95 male C57BL/6 mice (6~8 weeks old) were randomly divided into sham group (n=15), SAH groups (for 6, 12, 24, 48 and 72 h, respectively, n=8, 7, 17, 6 and 6), SAH+AAV9-NC group (n=19), and SAH+AAV9-sh-Senp1 group (n=17). Mouse model of SAH was established by intravascular puncture in the left internal carotid artery. Neurobehavioral scoring was used to evaluate neurological function, HE staining and FJC staining were employed to observe brain injury, RT-PCR was conducted to detect the knockdown of Senp1, Western blotting was applied to measure the expression of Senp1, NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD), PYD and CARD domain containing (ASC) and Caspase-1, and immunofluorescence assay was performed to observe the locations of Senp1 and NLRP3. **Results** SAH caused the elevated expression of Senp1, which reached a peak in 24 h and located in the cortical neurons. Compared with the sham group, the expression of Senp1, NLRP3, GSDMD, ASC and Caspase-1 were significantly enhanced in the SAH groups (P<0.01), with aggravation of nerve injury and neurological deficits. Administration of AAV9-sh-Senp1 resulted in significantly improved nerve injury and function, decreased expression of above proteins (P<0.01), and inhibited neuron pyroptosis when compared with the SAH+AAV9-NC group. **Conclusion** Senp1 promotes the occurrence of neuronal pyroptosis and mediates neuronal injury after SAH.

[**Key words**] Senp1; subarachnoid hemorrhage; pyroptosis; neuroinflammation

Supported by the General Program of National Nature Foundation of China (81870927) and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0112). Corresponding author: HE Zhaohui, E-mail: geno_he@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81870927);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0112)

[通信作者] 何朝晖,E-mail: geno_he@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage,SAH)是中风的一种严重亚型,通常发生在40~60岁的人群中,85%患者发病的主要原因是颅内动脉瘤破裂,并且致死率达到35%[1-2]。早期脑损伤(early brain injury,EBI)在SAH后的病理生理和预后中起到至关重要的作用,其导致神经元死亡和内皮细胞损伤,进而导致血脑屏障破坏和氧化应激、线粒体功能障碍、能量代谢紊乱,从而加重SAH的损伤和预后[3]。

焦亡是一种由焦孔素(gasdermins,GSDMs)介导的炎症性程序性死亡过程。研究表明NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)介导含PYD和CARD域蛋白(PYD and CARD domain containing, ACS)和半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)募集,激活焦孔素D(gasdermin D,GSDMD)、IL-1β和IL-18,促进焦亡发生[4-6]。XU等[7-8]研究报道,SAH后,与焦亡相关的NLRP3和GSDMD及下游炎症因子明显升高,加重了SAH后早期脑损伤过程中的炎症损伤。抑制NLRP3的表达还可以促进M1型小胶质细胞向M2型转化[9]。由此可见,NLRP3等炎性小体介导的焦亡在SAH后的神经炎症和早期脑损伤中起着至关重要的作用,但SAH后焦亡的激活及调控机制尚未完全阐明。

SUMO特异性蛋白酶1(SUMO-specific protease 1,Senp1)是SUMO特异性蛋白酶家族成员之一,是一种翻译后修饰的调控蛋白,可以去除与靶蛋白质相互结合的SUMO分子,起到去SUMO化修饰的作用[10]。SUMO化修饰和去SUMO化修饰调控蛋白质的稳定、定位及功能,从而参与转录、增殖、衰老等病理生理过程[11]。Senp1通过Sirt3以及HIF-1α信号通路调节神经元损伤[12-13]。SUMO化修饰NLRP3炎症小体后抑制焦亡发生,反之去SUMO化修饰激活NLRP3的表达促进焦亡的发生[14]。但SAH后Senp1是否可以调控焦亡发生尚不清楚。

结合上述文献分析,我们推测Senp1可能通过调控NLRP3活性介导焦亡的发生,并且在SAH后Senp1可能具有相同的作用。本实验将探究Senp1在SAH中介导焦亡发生的机制,为进一步研究Senp1在SAH后的作用机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

95只6~8周健康雄性C57BL/6小鼠,体质量20~25 g,购于重庆医科大学实验动物中心,许可证号:SCK(渝)2022-0010。按随机数字表法分为假手术(sham)组(n=15)、SAH(6、12、24、48、72 h)组(n=8、7、17、6、6)、SAH+AAV9-NC组(n=19)、SAH+AAV9-sh-Senp1组(n=17)。其中神经学评分及Western blot每组6只,免疫荧光、HE染色、FJC染色和透射电镜每组3只。所有小鼠脑组织标本参照MO等[15]方法评价SAH严重程度,排除8分以下及术中术后非预期死亡小鼠11只(SAH组5只、SAH+AAV9-NC组4只、SAH+AAV9-sh-Senp1组2只)。本实验中所用动物相关操作经重庆医科大学实验动物管理和使用委员会批准(IACUC-CQMU-2023-0235)。

1.2 SAH动物模型建立

SAH模型建立按本课题组之前的方法[16],戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,仰卧位置于手术台,沿颈正中切开,分离暴露左侧颈总动脉、颈内和颈外动脉。结扎并剪开颈外动脉,随后用5-0单丝经左颈外动脉残端,穿入颈内动脉至颅内段,行至大脑前动脉和中动脉分叉处感到阻力后继续插入穿孔,感到落空感后10 s拔出,结扎颈外动脉残端,恢复颈内动脉血流,缝合伤口后消毒。假手术组操作相同,但不穿破血管。术后将小鼠置于恒温电热毯上苏醒。

1.3 腺相关病毒体内侧脑室注射

对照腺相关病毒(AAV9-NC)和敲低Senp1腺相关病毒(AAV9-sh-Senp1)购于北京擎科生物科技有限公司,腺相关病毒序列,AAV9-sh-Senp1:5′-CAG-AUUAUCACUCAGAUAA-3′。在SAH造模前14 d腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,并固定于脑立体定位装置(Steeling,美国)。正中线切开头皮,按前囟后0.4 mm、左侧1.0 mm处钻孔,随后将10 μL微量注射器(Hamilton Co.,美国)从该孔深入硬膜层下方3.0 mm处,以0.5 μL/min的速度分别缓慢注射6 μL AAV9-NC(1.00×10^{13} vg/mL)和AAV9-sh-Senp1(1.81×10^{13} vg/mL)至左侧脑室。注射结束等待5 min后,缓慢推出微量注射器,骨蜡封闭钻孔后缝合头皮[7]。

1.4 神经行为学评分

改良Garcia评分和平衡木测试用于评价SAH后24 h神经损伤水平[16]。其中改良Garcia评分包含自主活动(0~3)、四肢运动对称性(0~3)、前爪伸展(0~3)、攀爬(1~3)、身体本体感觉(1~3)和触须触摸反应(1~3),总分18分,评分越高表明神经功能越好。将小鼠放在长1 m、宽6 mm的横梁上,根据1 min步行距离(0~5)评价小鼠运动平衡与协调能力。

1.5 脑水肿测量

脑水肿测量方式按本课题组之前的方法[16]:将每组小鼠SAH造模后24 h处死,解剖并取出完整大脑,剥离表面脑膜和血凝块,然后立即称质量(湿质量)并在105 ℃烘箱中保存72 h(干质量)。含水率按下式计算:含水率=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.6 RNA提取及定量RT-PCR

于SAH后24 h取各组小鼠左脑皮质,用TRIzol(TaKaRa,9108,日本)提取总RNA,随后用RT Master

Mix for qPCR Ⅱ(MCE,HY-K0510A,中国)在 T100™ 热循环仪上将 RNA 反转录为 cDNA(Bio-Rad,美国),然后使用 SYBR Green qPCR Master Mix(MCE,HY-K0523,中国)在 CFX Connect 实时系统(Bio-Rad,美国)上运行 RT-PCR。最后采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法测定基因表达水平,并与选定的内参基因 β-actin 进行比较。所有引物购自 TaKaRa 公司,小鼠 Senp1 引物为正义链:5′-GAGGCGACATTTCAGCACAG-3′,反义链:5′-TTGGAACTAAGACACCGAGACAG-3′;小鼠 β-actin 引物为正义链:5′-AGATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3′,反义链:5′-ACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-3′。

1.7 Western blot 检测

按文献[16-17]方法进行。SAH 后第 6、12、24、48、72 小时取小鼠左大脑半球并在液氮中快速冷冻,储存在-80 ℃。将蛋白质样品在 RIPA 裂解缓冲液中均质化,并在 4 ℃下以 12 000×*g* 离心 15 min。然后等量的蛋白质(50 μg)在 10%SDS-PAGE 凝胶上分离,并转移到 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,随后在一抗中 4 ℃下过夜温育,各一抗如下:抗 Senp1(1∶1 000,Abcam,ab236094,美国),抗 NLRP3(1∶1 000,Thermo Fisher Scientific,PA5-79740,美国),抗 GSDMD(1∶1 000,Abcam,ab219800,美国),抗 ASC(1∶500,SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY,sc-514414,美国),抗 Caspase-1(1∶1 000,proteintech,22915-1-AP,中国),抗 β-actin(1∶1 000,proteintech,66009-1-Ig,中国)。然后加入相应的二抗(1∶5 000,proteintech,SA00001-2/SA00001-1),常温孵育 1 h,最后使用化学发光试剂盒(ZEN-BIOSCIENCE,17047,中国)进行蛋白质检测。选择非饱和条带使用 Fusion 成像系统(Fusion fx 7 Spectra,法国)进行光密度定量,结果以相对于 β-actin 水平的百分比形式呈现。

1.8 HE 染色

按文献[16-17]方法进行。于 SAH 后 24 h 采用戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,生理盐水和 4%多聚甲醛心脏灌注后取出完整脑组织,固定脱水,石蜡包埋,随后将样品切成 5 μm 厚的石蜡切片。HE 染色:首先对脑切片进行脱蜡和水合;用苏木精(Beyotime,C0105s-1,中国)染色 5 min 并转移到水中洗涤,将切片短暂浸入 1% HCl/乙醇(Beyotime,C0165S,中国)30 s,用蒸馏水短暂洗涤 5 s;随后用曙红(Beyotime,C0105S-2,中国)染色 3 min,再次用蒸馏水洗涤 30 s;最后将脑切片梯度酒精脱水、二甲苯透明,密封。Carl Zeiss AxioCam HRc 相机(Zeiss,德国)采集图像。

1.9 FJC 染色

按照说明书操作。石蜡切片二甲苯脱蜡后浸泡于含有 80%乙醇的 10%氢氧化钠溶液 5 min,随后浸泡于 70%乙醇溶液 2 min,蒸馏水浸泡 2 min。继而 10%高锰酸钾溶液浸泡 10 min,降低背景噪影,蒸馏水浸泡 2 min。10% Fluro-Jade 染色液加 DAPI 室温孵育 10 min,蒸馏水漂洗 2 min。60 ℃烤干后二甲苯浸泡 5 min,中性树脂封片。共聚焦激光扫描显微镜(Zeiss,LSM780)观察神经元退行性改变。

1.10 免疫荧光染色

按文献[16-17]方法进行。切片制作方法同组织学染色。石蜡切片脱蜡水合后 0.5% Triton 溶液(Beyotime,ST797,中国)中透化细胞膜 30 min,并用 PBS 洗涤 15 min,然后置于 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH = 6.0)(Servicebio,G1201,中国)中抗原修复 100 ℃ 5 min,35 ℃ 15 min,随后冷却至室温并再次用 PBS 洗涤。在 10%山羊血清(Beyotime,C0265,中国)中于 37 ℃封闭 1 h,最终将切片与一抗一起孵育,在 4 ℃过夜。将切片与二抗在 37 ℃下孵育 1 h。最后用 DAPI(Beyotime,P0131,中国)通过抗淬灭封片剂密封切片。使用共聚焦激光扫描显微镜(Zeiss,LSM780)捕获图像并通过 Image J 软件进行分析。使用的抗体是:小鼠抗 Senp1(1∶200,Abcam,ab236094,美国)、兔抗 NeuN(1∶200,Abcam,ab177487,美国)、兔抗 GFAP(1∶200,proteintech,60190-1-Ig,中国)、兔抗 Iba-1(1∶200,proteintech,66827-1-Ig,中国)、山羊抗小鼠 Cy3(1∶100,proteintech,SA00009-2,中国)和山羊抗兔 Alexa Fluor 488(1∶100,Abcam,ab150113,美国)。

1.11 透射电镜观察

按文献[16-17]方法进行。2.5%戊二醛+4%多聚甲醛灌注小鼠,取出脑组织,将左侧脑皮质切成 1~2 mm^3 大小的方块并固定于 2.5%戊二醛+4%多聚甲醛溶液中固定,4 ℃避光保存;取出组织方块 PBS 洗涤 15 min,1%锇酸固定 2 h;将组织块依次浸入 50%、70%、90%、90%乙醇∶90%、90%、100%丙酮溶液中梯度脱水后包埋切片;3%醋酸铀-枸橼酸铅染色,透射电子显微镜(Hitachi,日本)观察神经元胞膜表面焦亡小孔的形成。

1.12 ELISA 检测

参考说明书操作。洗涤缓冲液每孔 350 μL,静置 40 s 后甩干,重复 3 次;每孔分别加入 100 μL 样本稀释液或样品,37 ℃孵育 2 h;生物素化抗体工作液每孔 100 μL,37 ℃孵育 1 h;链霉亲和素-HRP 工作液每孔 100 μL,37 ℃孵育 30 min;TMB 底物每孔 100 μL,37 ℃避光孵育 20 min;终止液每孔 50 μL,分别测量 450 nm 和 570 nm 处的吸光度相减后计算得到 IL-1β(abclonal,RK04878,中国)和 IL-18(abclonal,RK00104,中国)含量。

1.13 统计学分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 10.0.3

(GraphPad Software,美国)进行统计分析。Shapiro-Wilk 检验对数据进行正态性检验,Brown-Forsythe 检验对数据进行方差同质性检验。Student's-*t* 检验分析 2 组之间的差异。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较多组之间的平均值差异。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SAH 后 Senp1 表达升高

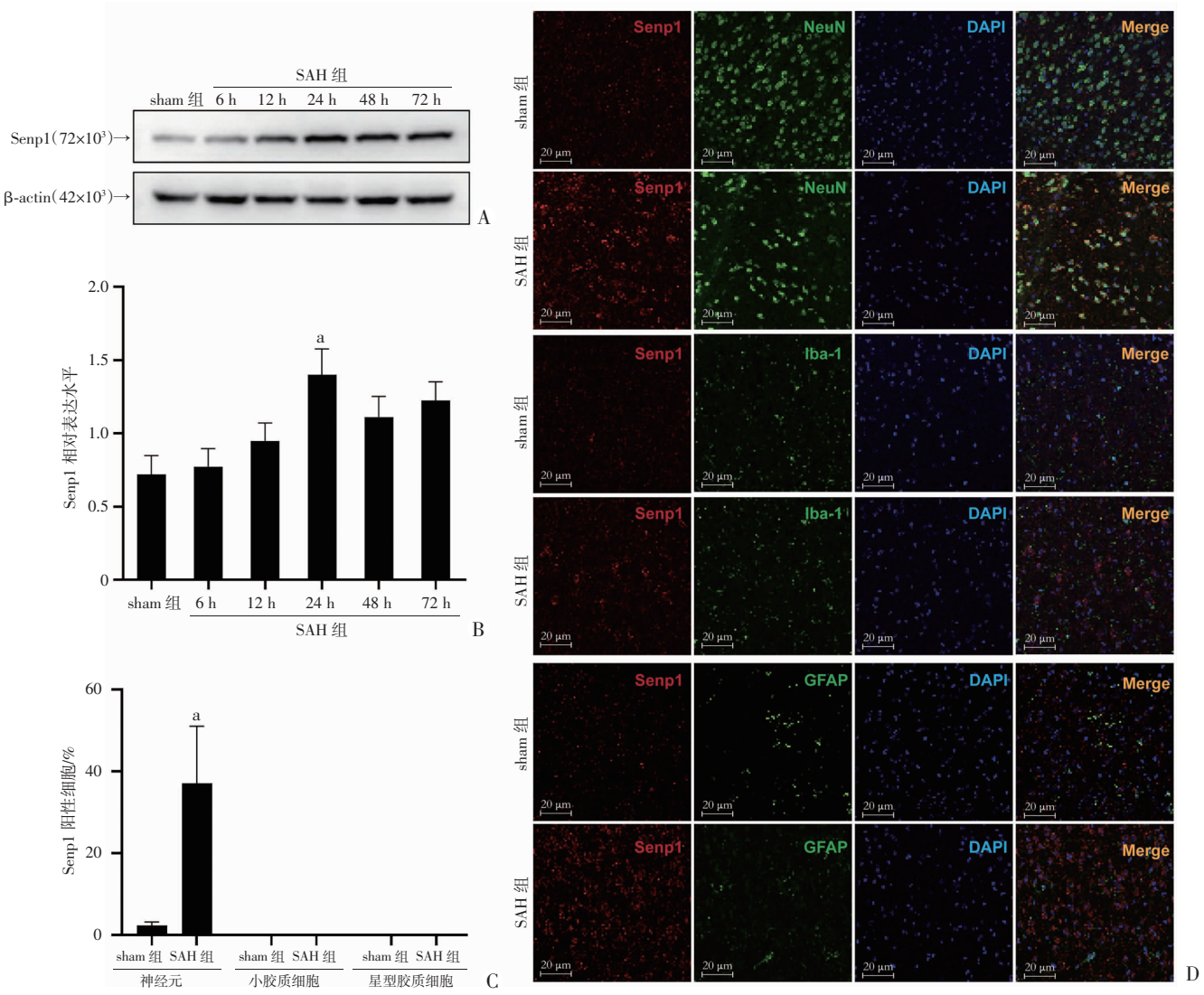
采用 Western blot 检测 sham 组和 SAH 组(6、12、24、48、72 h)Senp1 的表达。结果表明,与 sham 组比较,SAH 后 Senp1 表达随着时间呈现先升高后降低的趋势,在 24 h 时表达最高($P<0.05$),随后开始下降(图 1A、B)。基于以上结果,选择 24 h 这一时间点进行后续实验。

2.2 SAH 后 Senp1 主要定位于脑皮质神经元中

为了探究 Senp1 主要表达位置,采用免疫荧光染色分别检测 Senp1 与神经元(NeuN)、小胶质细胞(Iba-1)和星型胶质细胞(GFAP)的共定位情况。结果显示,在 SAH 后 24 h,Senp1 表达明显升高,并且主要定位于脑皮质神经元中,小胶质细胞和星型胶质细胞中未见明显表达(图 1C、D)。

2.3 腺相关病毒敲低后 Senp1 的表达变化

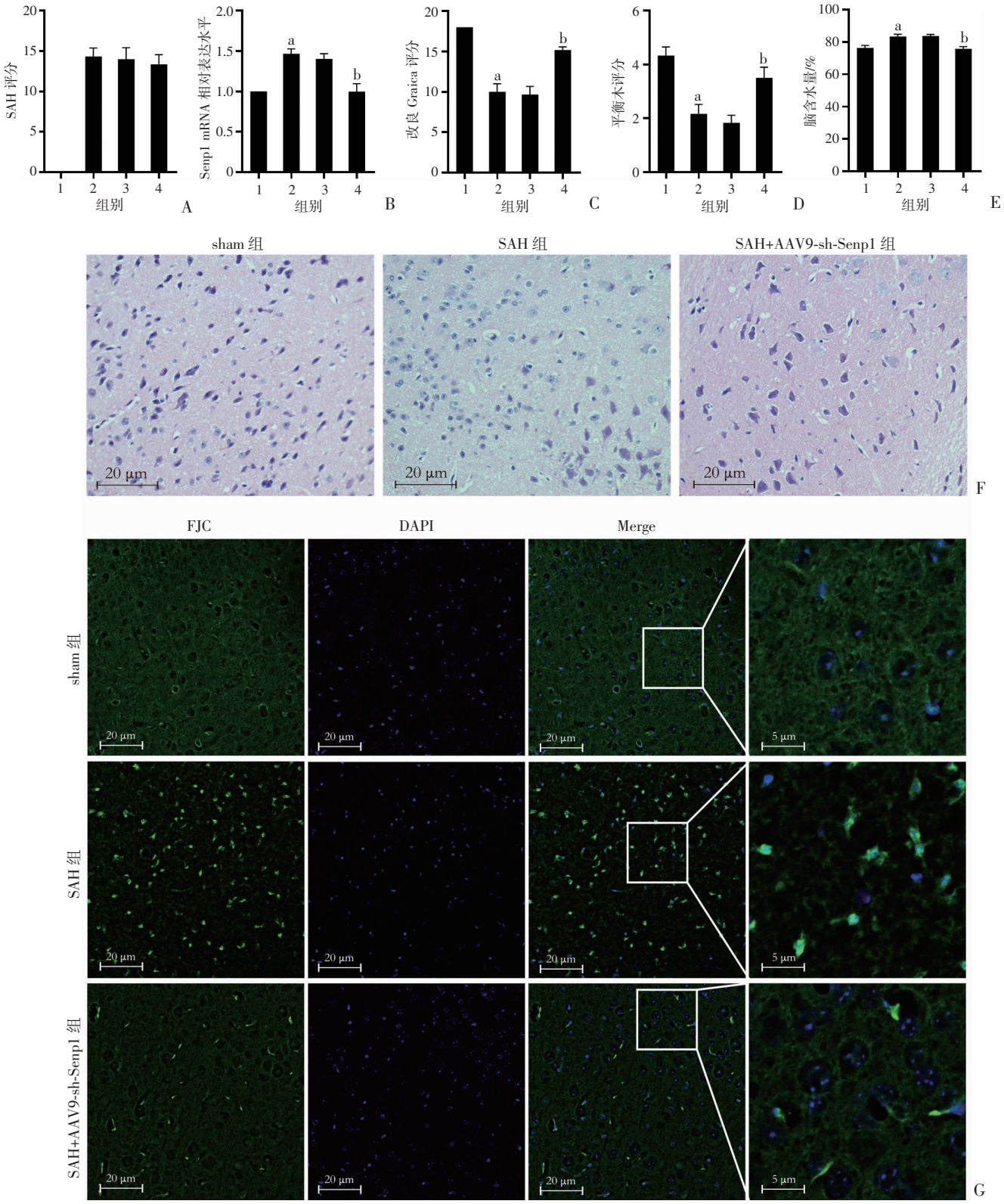
基于 SAH 后 Senp1 表达升高,本实验通过侧脑室注射腺相关病毒转导对 Senp1 基因进行下调处理,SAH 评分表明各实验组小鼠之间出血程度无明显差异(图 2A)。RT-PCR 检测结果表明,相比于 SAH+AAV9-NC 组,给予 AAV9-sh-Senp1 后,Senp1 的 mRNA 水平明显降低($P<0.01$,图 2B),表明给予 AAV9-sh-Senp1 有效敲低了 Senp1 的基因表达。



a:$P<0.05$,与 sham 组比较

A、B:Western blot 检测 SAH 后早期脑损伤期间不同时间点 Senp1 的表达;C、D:免疫荧光检测 SAH 后 Senp1 表达明显增加

图 1 Senp1 在 SAH 后早期脑损伤期间的时间表达和定位



1:sham 组;2:SAH 组;3:SAH+AAV9-NC 组;4:SAH+AAV9-sh-Senp1 组;a:$P<0.01$,与 sham 组比较;b:$P<0.01$,与 SAH+AAV9-NC 组比较

A:各组小鼠 SAH 严重程度评分;B:RT-PCR 检测 SAH 后 Senp1 的 mRNA 表达;C:小鼠的神经行为学评分;D:小鼠平衡木实验评分;E:小鼠的脑水含量检测;F:HE 染色检测 SAH 后神经元损伤情况;G:FJC 染色检测 SAH 后神经元退行性改变

图 2 Senp1 在 SAH 后早期脑损伤和神经功能障碍中的作用

2.4 SAH 后 Senp1 对神经功能及脑含水量的影响

SAH 会导致小鼠的神经功能损伤和脑水肿的发生。因此本实验在敲低 Senp1 后检测神经功能和脑水肿的变化。与 sham 组相比,SAH 组小鼠在改良 Garcia 评分和平衡木测试中表现出明显的神经功能损伤($P<0.01$),小鼠脑含水量明显增加。与 SAH+AAV9-NC 组相比,给予 AAV9-sh-Senp1 后可减轻小鼠神经功能障碍,脑水肿明显改善($P<0.01$,图 2C~E)。

2.5 敲低 Senp1 后改善神经元损伤

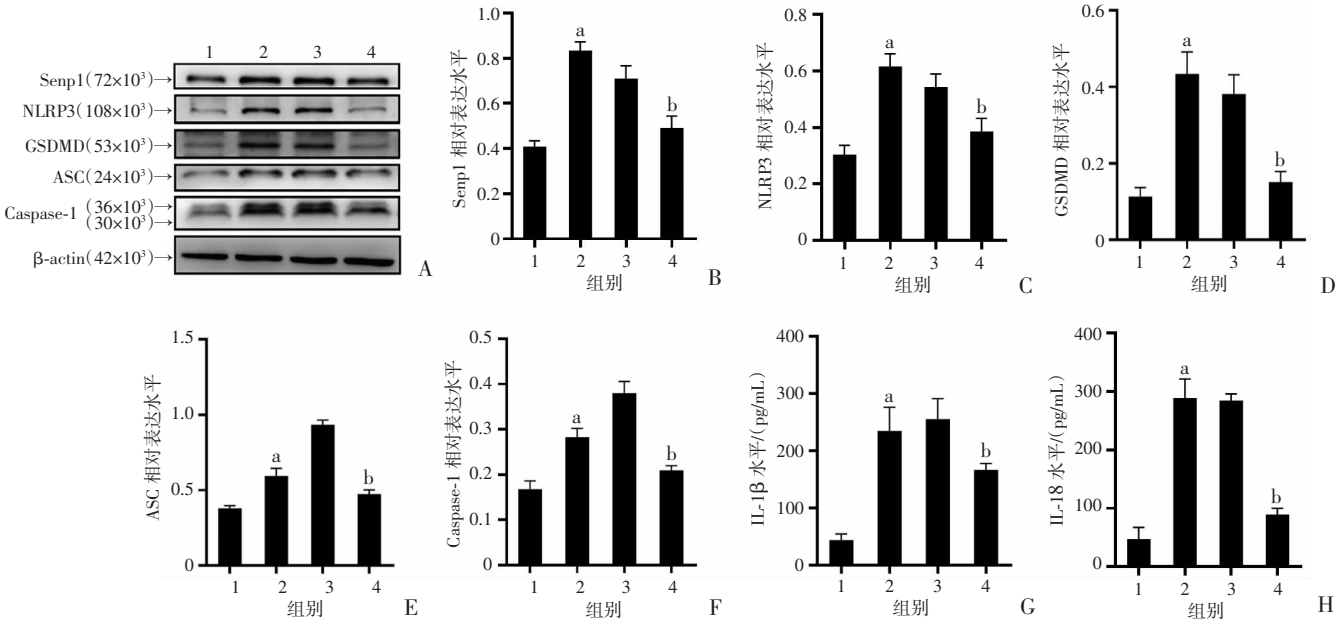
前期实验发现 Senp1 主要表达于神经元中,于是在敲低 Senp1 后采用 HE 染色和 FJC 染色观察脑皮质神经元损伤情况。脑皮质 HE 染色发现 SAH 后脑皮质神经元受损,在给予 AAV9-sh-Senp1 后神经元损伤程度有所改善(图 2F)。FJC 染色表明,SAH 后神经元发生退行性改变,敲低 Senp1 后神经元的退行性改变有所减轻(图 2G)。上述结果表明,Senp1 在 SAH 后介导神经元损伤。

2.6 Senp1 参与 SAH 后神经元焦亡的发生

既往研究表明 SAH 后神经元会发生焦亡,因此本实验在敲低 Senp1 后评估 Senp1 对神经元焦亡的影响。采用 Western blot 检测焦亡蛋白表达,结果显示,与 sham 组相比,SAH 后焦亡被激活,NLRP3、GSDMD、ASC、Caspase-1 等焦亡蛋白表达明显升高($P<0.01$)。在给予 AAV9-sh-Senp1 后,相较于 SAH+AAV9-NC 组,Senp1 蛋白表达明显被抑制,并且 NLRP3、GSDMD、ASC、Caspase-1 的表达也明显降低($P<0.05$,图 3A~F)。ELISA 检测各组 IL-1β 和 IL-18 的水平,与 sham 组相比,SAH 组小鼠 IL-1β 和 IL-18 的水平显著升高($P<0.01$),敲低 Senp1 后 IL-1β 和 IL-18 水平明显降低($P<0.05$,图 3G、H)。随后用免疫荧光检测焦亡调控蛋白 NLRP3 的表达,结果显示 SAH 后 NLRP3 表达明显升高并聚集于神经元胞质中,相比于 SAH+AAV9-NC 组,SAH+ AAV9-sh-Senp1 明显抑制了 NLRP3 的表达($P<0.05$,图 4A、B)。透射电镜观察结果显示,敲低 Senp1 表达后神经元胞膜焦亡小孔有所减少(图 4C)。以上结果表明,SAH 后 Senp1 表达的升高可能促进了神经元焦亡发生,并加重了早期脑损伤。

3 讨论

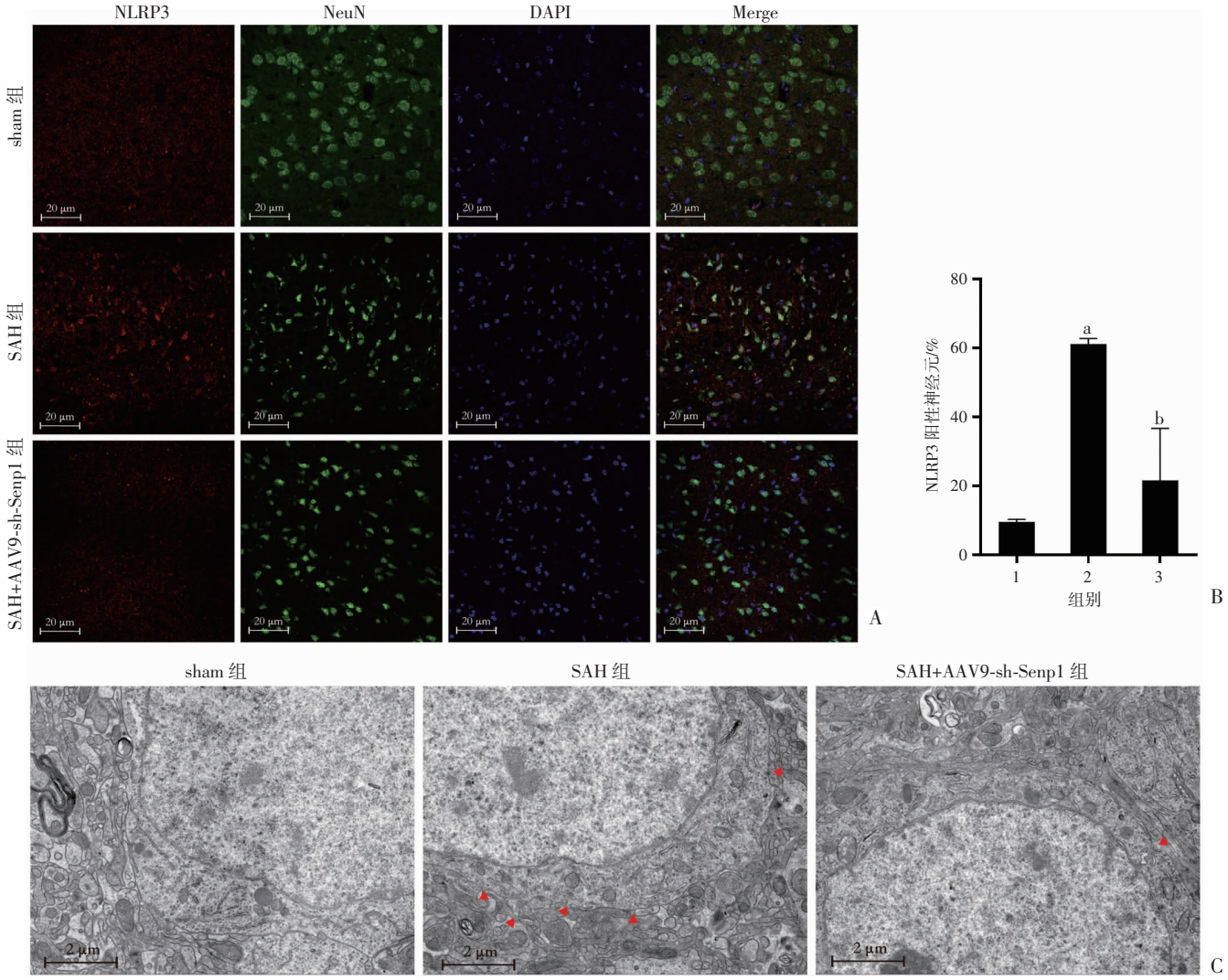
SAH 作为神经外科常见的危急重症,近年来针对其病理生理机制的研究重点逐渐聚焦于 72 h 内的早期脑损伤[18]。研究发现早期脑损伤期间会发生神经元死亡、神经炎症、氧化级连反应、脑水肿、血脑屏障破坏以及微循环功能障碍等复杂的病理生理过程,并且认为是 SAH 后患者神经功能障碍以及预后不良的重要原因[19]。因此,早期脑损伤受到越来越多研究者的



1:sham 组;2:SAH 组;3:SAH+AAV9-NC 组;4:SAH+AAV9-sh-Senp1 组;a:$P<0.01$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH+AAV9-NC 组比较

A~F:Western blot 检测敲低 Senp1 后 Senp1、NLRP3、GSDMD、Caspase-1 和 ASC 蛋白的表达及半定量分析;G、H:ELISA 检测敲低 Senp1 后 IL-1β 和 IL-18 的水平

图 3 Senp1 下调后对神经元焦亡的影响



A、B:双重免疫荧光检测敲低 Senp1 后 NLRP3 在神经元的定位表达 1:sham 组;2:SAH 组;3:SAH+AAV9-sh-Senp1 组;a:$P<0.05$,与 sham 组比较;b:$P<0.05$,与 SAH 组比较;C:透射电镜观察敲低 Senp1 后神经元胞膜形态 红色箭头:示焦亡小孔

图 4 敲低 Senp1 后 NLRP3 在神经元中的表达及细胞形态

关注,成为目前的研究热点。早期脑损伤的病理机制中神经元死亡的发生被认为是主要原因,神经元死亡受到多种信号通路的调控,包括凋亡、铁死亡、自噬以及焦亡等[20]。YUAN 等[21]研究表明,抑制炎性小体 AIM2 的活性可以明显改善 SAH 后 GSDMD 介导的焦亡发生,从而改善早期脑损伤。上述研究结果表明焦亡在 SAH 后的早期脑损伤中具有至关重要的作用,但目前 SAH 后焦亡的调控机制并未完全阐明。

焦亡是一种程序性的细胞死亡方式,与凋亡不同,焦亡表现为一种坏死性、炎症性和溶解性的死亡,特征是在细胞膜表面形成孔道,促进炎性介质的释放[22]。既往研究表明,NLRP3 是中枢神经系统中最主要的炎性小体,并且主要位于小胶质细胞中[23],近期在神经元和星型胶质细胞中也发现了焦亡的激活[24]。SAH 后 24 h 可见焦亡明显激活,并且促进神经元死亡,加重早期脑损伤[21]。为进一步探究焦亡的激活途径以及对早期脑损伤的影响,本研究构建 SAH 小鼠模型,给予腺相关病毒干预并观察焦亡的发生。

Senp1 作为一种蛋白翻译后修饰的调控分子,在中枢神经系统疾病的病理生理中有重要作用。ZHANG 等[25]研究发现,特异性敲除 Senp1 后明显加重了脑缺血再灌注引起的脑损伤和神经功能缺损。剥夺神经元的氧和葡萄糖后 Senp1 的表达明显升高,并且 Senp1 介导的去 SUMO 化修饰促使神经元的死亡[26]。表明神经元的 SUMO 化修饰具有神经保护作用。但 Senp1 是否在 SAH 后也参与神经元的损伤尚未研究。本研

究发现 SAH 后 Senp1 逐渐升高,在 24 h 时达到峰值,随后开始下降,主要表达于神经元中,在小胶质细胞和星型胶质细胞中未见表达。敲低 Senp1 可以看到 NLRP3 介导的焦亡被抑制,同时还发现小鼠的神经行为学评分和神经元损伤明显改善。研究表明 NLRP3 蛋白中有 6 个可以和 SUMO 蛋白结合的序列,SUMO1 作为调节 SUMO 化的主要蛋白,在 SUMO 化结合酶 UBC9 的作用下将 SUMO1 与 NLRP3 相互作用,进而影响 NLRP3 与 ASC 的组装,Senp6 和 Senp7 去除 NLRP3 中的 SUMO 分子使 NLRP3 激活,并促进焦亡的发生[14,27]。由此可见,去 SUMO 化修饰可以明显促进 NLRP3 的活性表达和组装,但 Senp1 是否也可以直接调控 NLRP3 的去 SUMO 化修饰尚未有研究证实,需进一步深入研究。以上结果表明,Senp1 在 SAH 后神经元焦亡的发生中具有至关重要的作用。

综上所述,本研究证实 Senp1 参与 SAH 后 NLRP3 介导的焦亡激活,并且行为学实验结果也表明 Senp1 可以改善 SAH 后的神经功能和早期脑损伤,阐明了 Senp1 参与 SAH 后焦亡发生的可能机制。本研究缺乏神经元的体外细胞实验验证 Senp1 对 SAH 后焦亡的影响,并且尚未对 Senp1 介导焦亡活化的具体通路进行深入研究。因此,本课题组后期将进一步探究 Senp1 是如何调控 NLRP3 去 SUMO 化修饰,进而参与 SAH 后焦亡激活,并为临床工作提供新的治疗方案。

参考文献:

[1] CLAASSEN J, PARK S. Spontaneous subarachnoid haemorrhage[J]. Lancet, 2022, 400(10355): 846-862. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00938-2.

[2] NEIFERT S N, CHAPMAN E K, MARTINI M L, *et al*. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: the last decade[J]. Transl Stroke Res, 2021, 12(3): 428-446. DOI: 10.1007/s12975-020-00867-0.

[3] ETMINAN N. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: status quo and perspective[J]. Transl Stroke Res, 2015, 6(3): 167-170. DOI: 10.1007/s12975-015-0398-6.

[4] YU P, ZHANG X, LIU N, *et al*. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5.

[5] KOVACS S B, MIAO E A. Gasdermins: effectors of pyroptosis[J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(9): 673-684. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.05.005.

[6] COLL R C, SCHRODER K, PELEGRÍN P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(8): 653-668. DOI: 10.1016/j.tips.2022.04.003.

[7] XU P F, TAO C R, ZHU Y Y, *et al*. TAK1 mediates neuronal pyroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 188. DOI: 10.1186/s12974-021-02226-8.

[8] XU P F, HONG Y, XIE Y, *et al*. TREM-1 exacerbates neuroinflammatory injury *via* NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2021, 12(4): 643-659. DOI: 10.1007/s12975-020-00840-x.

[9] XIA D Y, YUAN J L, JIANG X C, *et al*. SIRT1 promotes M2 microglia polarization *via* reducing ROS-mediated NLRP3 inflammasome signaling after subarachnoid hemorrhage[J]. Front Immunol, 2021, 12: 770744. DOI: 10.3389/fimmu.2021.770744.

[10] YANG D, FAN D, GUO Z, *et al*. SENP1 protects against pressure overload-induced cardiac remodeling and dysfunction *via* inhibiting STAT3 signaling[J]. J Am Heart Assoc, 2022, 11(22): e027004. DOI: 10.1161/JAHA.122.027004.

[11] SAHIN U, DE THÉ H, LALLEMAND-BREITENBACH V. Sumoylation in physiology, pathology and therapy[J]. Cells, 2022, 11(5): 814. DOI: 10.3390/cells11050814.

[12] CAI H, BIAN X Y, CHEN L Y, *et al*. Selective intra-arterial brain cooling induces cerebral protection against ischemia/reperfusion injury through SENP1-Sirt3 signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 171: 272-283. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.026.

[13] GU J M, FAN Y Q, LIU X B, *et al*. SENP1 protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury *via* a HIF1α-dependent pathway[J]. Cardiovasc Res, 2014, 104(1): 83-92. DOI: 10.1093/cvr/cvu177.

[14] BARRY R, JOHN S W, LICCARDI G, *et al*. SUMO-mediated regulation of NLRP3 modulates inflammasome activity[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3001. DOI: 10.1038/s41467-018-05321-2.

[15] MO J, ENKHJARGAL B, TRAVIS Z D, *et al*. AVE 0991 attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis *via* Mas/PKA/CREB/UCP-2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Redox Biol, 2019, 20: 75-86. DOI: 10.1016/j.redox.2018.09.022.

[16] FU W Q, CHE X D, TAN J H, *et al*. Rasd1 is involved in white matter injury through neuron-oligodendrocyte communication after subarachnoid hemorrhage[J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(3): e14452. DOI: 10.1111/cns.14452.

[17] XIN Y J, CHEN J, ZHANG H X, *et al*. Dexras1 induces dysdifferentiation of oligodendrocytes and myelin injury by inhibiting the cAMP-CREB pathway after subarachnoid

hemorrhage[J]. Cells, 2022, 11(19): 2976. DOI: 10.3390/cells11192976.

[18] RASS V, HELBOK R. Early brain injury after poor-grade subarachnoid hemorrhage[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2019, 19(10): 78. DOI: 10.1007/s11910-019-0990-3.

[19] LAUZIER D C, JAYARAMAN K, YUAN J Y, *et al*. Early brain injury after subarachnoid hemorrhage: incidence and mechanisms[J]. Stroke, 2023, 54(5): 1426-1440. DOI: 10.1161/STROKEAHA.122.040072.

[20] CHEN J H, LI M C, LIU Z H, *et al*. Molecular mechanisms of neuronal death in brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1025708. DOI: 10.3389/fncel.2022.1025708.

[21] YUAN B, ZHOU X M, YOU Z Q, *et al*. Inhibition of AIM2 inflammasome activation alleviates GSDMD-induced pyroptosis in early brain injury after subarachnoid haemorrhage[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1): 76. DOI: 10.1038/s41419-020-2248-z.

[22] LOVELESS R, BLOOMQUIST R, TENG Y. Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 264. DOI: 10.1186/s13046-021-02065-8.

[23] 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. DOI: 10.7150/ijbs.45467.

[24] MOONEN S, KOPER M J, VAN SCHOOR E, *et al*. Pyroptosis in Alzheimer's disease: cell type-specific activation in microglia, astrocytes and neurons[J]. Acta Neuropathol, 2023, 145(2): 175-195. DOI: 10.1007/s00401-022-02528-y.

[25] ZHANG H J, WANG Y, ZHU A X, *et al*. SUMO-specific protease 1 protects neurons from apoptotic death during transient brain ischemia/reperfusion[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(11): e2484. DOI: 10.1038/cddis.2016.290.

[26] CIMAROSTI H, ASHIKAGA E, JAAFARI N, *et al*. Enhanced SUMOylation and SENP-1 protein levels following oxygen and glucose deprivation in neurones[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(1): 17-22. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.146.

[27] SHAO L Y, LIU Y, WANG W B, *et al*. SUMO1 SUMOylates and SENP3 deSUMOylates NLRP3 to orchestrate the inflammasome activation[J]. FASEB J, 2020, 34(1): 1497-1515. DOI: 10.1096/fj.201901653R.

(收稿:2024-01-21;修回:2024-03-24)

(编辑 吴培红)