卓越医见：脓毒症发生机制与临床治疗

DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003832

儿童脓毒症胶质细胞焦亡信号活化及其对神经细胞线粒体损伤的影响力

邢　静，王艳飞，闫慧娟，王新梅，刘振奎
（河北北方学院附属第一医院儿内科，张家口　075000）

【摘　要】**目的**：探讨儿童脓毒症相关脑病（sepsis-associated encephalopathy，SAE）胶质细胞焦亡信号活化及其对神经细胞线粒体损伤的影响力。**方法**：纳入河北北方学院附属第一医院2020年4月至2024年3月儿童重症监护病房（pediatric intensive care unit，PICU）26例脓毒症患者，包括15例SAE和11例非SAE。采用实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，qPCR）定量血清中线粒体DNA（mitochondrial DNA，mtDNA），酶联免疫吸附法检测血清中S100钙结合蛋白B（S100 calcium-binding protein B，S100B）、神经特异性烯醇化酶（neuron-specific enolase，NSE）水平。将BV2细胞分为Con组、mtDNA组、si-cGAS组、mtDNA+si-cGAS组、mtDNA+cGAS-oe组和mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk组。采用蛋白质印迹检测核因子κB/NOD样受体热蛋白结构域蛋白3（nuclear factor kappa-B/NOD-like receptor pyrin domain containing 3，NF-κB/NLRP3）信号，流式细胞术检测细胞焦亡。**结果**：SAE组在住院第4、7天的血清mtDNA水平明显高于非SAE组（$P<0.05$）。血清mtDNA水平与NSE、S100B水平呈正相关（$P<0.05$）。转染si-cGAS明显逆转了mtDNA对BV2细胞NF-κB/NLRP3信号激活和细胞焦亡的影响（$P<0.05$）。与mtDNA组相比，mtDNA+cGAS-oe组BV2细胞中cGAS、p-NF-κB、NLRP3、Cleaved caspase-1蛋白表达和细胞焦亡率明显增加（$P<0.05$）。与mtDNA+cGAS-oe组相比，mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk组BV2细胞中Cleaved caspase-1蛋白表达和细胞焦亡率明显降低（$P<0.05$）。**结论**：脓毒症患儿血清mtDNA水平与NSE、S100B水平变化密切相关，其可能以cGAS依赖方式促进BV2细胞NF-κB/NLRP3信号激活和细胞焦亡。

【关键词】儿童；脓毒症脑损伤；线粒体DNA；胶质细胞；细胞焦亡
【中图分类号】R459.7　　【文献标志码】A

Activation of glial cell pyroptosis signal in children with sepsis and its influence on mitochondrial injury in neural cells

Xing Jing，*Wang Yanfei*，*Yan Huijuan*，*Wang Xinmei*，*Liu Zhenkui*
（*Department of Pediatrics*，*The First Affiliated Hospital of Hebei North University*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the activation of glial cell pyroptosis signal in children with sepsis-related encephalopathy（SAE）and its influence on mitochondrial injury in neural cells. ***Methods***：A total of 26 patients with sepsis who were admitted to the First Affiliated Hospital of Hebei North University from April 2020 to March 2024 were enrolled，among whom there were 15 SAE patients and 11 non-SAE patients. Quantitative PCR was used to measure mitochondrial DNA（mtDNA）in serum，and ELISA was used to measure the serum levels of S100 calcium-binding protein B（S100B）and neuron-specific enolase（NSE）. BV2 cells were divided into Con group，mtDNA group，si-cGAS group，mtDNA+si-cGAS group，mtDNA+cGAS-oe group，and mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk group. Western blotting was used to analyze nuclear factor kappa-B/NOD-like receptor pyrin domain containing 3（NF-κB/NLRP3）signal，and flow cytometry was used to measure cell pyroptosis. ***Results***：The SAE group had a significantly higher serum level of mtDNA than the non-SAE group in days 4 and 7 of hospitalization（$P<0.05$）. The serum level of mtDNA was positively correlated with the serum levels of NSE and S100B（$P<0.05$）. Transfection of si-cGAS significantly reversed the effect of mtDNA on NF-κB/NLRP3 signal activation and cell pyroptosis in BV2 cells（$P<0.05$）. Compared with the mtDNA group，the mtDNA+cGAS-oe group had significant increases in the protein expression levels of cGAS，p-NF-κB，NLRP3，and cleaved caspase-1 and cell pyroptosis rate in BV cells（$P<0.05$）. Compared with the mtDNA+cGAS-oe group，the mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk group had significant reductions in the protein expression level of cleaved caspase-1 and cell

作者介绍：邢　静，Email：ywvugwmbz1@163.com，
研究方向：儿科感染性疾病和肾脏疾病。

基金项目：河北省2020年度医学科学研究课题资助项目（编号：20200503）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250417.1706.004（2025-04-18）

pyroptosis rate in BV2 cells（$P<0.05$）. ***Conclusion***: The serum level of mtDNA in children with sepsis is closely associated with the changes in the serum levels of NSE and S100B, and the increase in mtDNA may promote the activation of NF-κB/NLRP3 signal and cell apoptosis in BV2 cells in a cGAS-dependent manner.

【Key words】children; sepsis-related encephalopathy; mitochondrial DNA; glial cell; cell pyroptosis

脓毒症定义为威胁生命的器官功能障碍，由宿主对感染的反应失调引起，已成为儿科重症监护病房（pediatric intensive care unit，PICU）中常见的危重疾病[1]。超过50%的脓毒症患者合并脓毒症相关脑病（sepsis-associated encephalopathy，SAE），主要表现为弥漫性皮质损伤，常发生在其他器官功能障碍之前[2]。SAE的发病机制复杂，包括细胞因子风暴、氧化应激、线粒体损伤、凋亡和细胞焦亡[3]。临床上，SAE缺乏特定的治疗方法，只能提供对症支持，常导致SAE患儿出现神经系统后遗症[4]。证据表明，线粒体功能障碍与多种神经退行性疾病有关。线粒体DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）在线粒体功能障碍中起重要作用，其通过激活NOD样受体热蛋白结构域蛋白3（NOD-like receptor pyrin domain containing 3，NLRP3）炎症小体信号，并导致胱天蛋白酶-1依赖性细胞焦亡[5]。在炎症环境中，神经元出现线粒体功能障碍，并释放mtDNA诱导邻近的免疫细胞发生细胞焦亡，如星形胶质细胞和小胶质细胞，后者是中枢神经系统的主要免疫防线，在脑内发挥着免疫监视作用[6]。此外，临床研究显示血浆mtDNA水平可能是脓毒症患儿诊断和预后的潜在生物标志物[7]。因此，推测mtDNA可能在儿科SAE患者的诊断和预后中发挥作用，但相关研究较少。本研究探讨循环mtDNA水平是否可以作为儿科SAE患者的有用生物标志物，并通过体外实验进一步分析mtDNA在介导神经细胞线粒体损伤和小胶质细胞焦亡中的作用，旨在为开发SAE患儿诊断和预后的潜在生物标志物提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究是在河北北方学院附属第一医院PICU进行的观察性和回顾性研究，数据收集时间为2020年4月至2024年3月，研究经本院伦理审查委员会批准[批准号：（伦审）2020第0104号]，患儿家属签署知情同意书。纳入标准：患儿均符合美国重症监护医学学会/欧洲重症监护医学学会制定的脓毒症-3诊断标准[8]，年龄1个月至18岁。排除标准：家属拒绝签署知情同意书；接受姑息治疗；有药物、有毒物质、乙醇、工业制剂、重金属或任何已知会引起意识水平变化的物质接触史；有影响认知功能的中枢神经系统急性疾病，如病原体（病毒、真菌或细菌）引起的脑膜脑炎或脱髓鞘综合征；癫痫；非进行性慢性脑病；原发性免疫缺陷；癌症；在纳入研究前6个月内使用免疫抑制剂；在纳入研究后由临床事件如颅内出血、心脏骤停后的缺氧缺血性脑病、急性低血糖症、严重低钠血症或高钠血症引起的意识水平变化。SAE诊断的最早时间为PICU入院后8 h。SAE定义为脓毒症合并精神状态改变、认知或行为异常，以及患者在PICU期间的格拉斯哥昏迷评分（Glasgow coma score，GCS）≤14[9]。SAE的认知和神经精神症状包括注意力不集中、意识模糊、焦虑、精神运动功能下降、嗜睡、木僵和昏迷。

1.2 方法

1.2.1 数据收集 在PICU入院时，收集了以下数据：人口统计学资料、共病、感染部位、GCS、脓毒症的病因、PICU住院时间和死亡率。诊断后第1周内，每天收集至少1份血样用于检测S100钙结合蛋白B（S100 calcium-binding protein B，S100B）、神经特异性烯醇化酶（neuron-specific enolase，NSE）和mtDNA。

1.2.2 血浆S100B和NSE水平分析 将血液样本收集在含有乙二胺四乙酸以及其盐的采血管中，并在4 ℃下以700×*g*离心5 min。采用酶联免疫吸附测定试剂盒（美国R&D系统公司）检测血浆NSE和S100B。

1.2.3 血浆mtDNA水平分析 将血液样本收集在含有乙二胺四乙酸以及其盐的采血管中，并在4 ℃下以700×*g*离心5 min。采用QIAamp DNA血液微型试剂盒（德国Qiagen公司）从血浆中提取DNA。然后，进行实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time quantitative polymerase chain reaction，qPCR）定量mtDNA。引物序列如下：mtDNA，正向5′-CACAGAAGCTGCCATCAAGTA-3′；反向5′-CCGGAGAGT ATATTGTTGAAGAG-3′。采用Genbank搜索验证mtDNA引物的特异性，并通过分光光度计测定mtDNA水平。

1.2.4 细胞培养、转染、分组 小鼠小胶质细胞BV2细胞和小鼠海马细胞HT22细胞获自美国ATCC。将细胞接种在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的杜氏改良Eagle培养基（Dulbecco′s modified eagle medium，DMEM）（美国Hyclone公司）中培养。为了在体外模拟SAE，HT22细胞用1 μg/mL脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）（美国Sigma公司）

处理24 h，收集经LPS处理的HT22细胞培养上清液并提取mtDNA，用于后续刺激BV2细胞[10]。

为了研究环GMP-AMP合酶（cyclic GMP-AMP synthase，cGAS）对BV2细胞活化的影响，采用cGAS siRNA（si-cGAS）或cGAS过表达载体（cGAS-OE）转染BV2细胞。将BV2细胞接种到24孔板中，培养至70%汇合。采用Lipofectamine 3000试剂（美国Invitrogen公司）转染24 h。si-cGAS以及cGAS-OE购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

细胞分组如下：①实验1考察不同浓度mtDNA对BV2细胞活化的影响，将BV2细胞分为对照组（Con）和不同mtDNA浓度（100、200、400 ng/mL）处理组，其中Con组加入空白培养基处理24 h，不同mtDNA浓度（100、200、400 ng/mL）处理组加入对应浓度mtDNA处理24 h。②实验2考察HT22细胞来源的mtDNA是否通过cGAS影响BV2细胞活化，将BV2细胞分为Con组、mtDNA组、si-cGAS组、mtDNA+si-cGAS组。其中，si-cGAS组、mtDNA+si-cGAS组转染si-cGAS，mtDNA+si-cGAS组在转染24 h后加入200 ng/mL mtDNA处理24 h。mtDNA组加入200 ng/mL mtDNA处理24 h。Con组加入空白培养基处理24 h。③实验3考察阻断caspase-1激活减轻cGAS过表达在加重mtDNA诱导BV2细胞焦亡中的作用，将BV2细胞分为Con组、mtDNA组、mtDNA+cGAS-oe组和mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk组。其中，mtDNA组、mtDNA+cGAS-oe组和mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk组加入200 ng/mL mtDNA处理24 h，mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk组在处理前转染cGAS-oe 24 h，并用YVAD-cmk（25 mg/mL）预处理细胞1 h。mtDNA+cGAS-oe组在处理前转染cGAS-oe 24 h。Con组加入空白培养基处理24 h。

1.2.5 细胞mtDNA分离和定量 收集经LPS处理的HT22细胞培养上清液，采用线粒体DNA分离试剂盒（美国Abcam公司）从上清液中分离mtDNA。采用小鼠mt-ATP6引物/Taqman 5'FAM-3'MGB探针（美国Bio-Rad公司）对mtDNA进行定量。

为了评估BV2细胞吞噬HT22细胞释放的mtDNA，使用PCR将Cy5-dCTP（Amersham Cy5-dCTP，美国GE Healthcare公司）标记mtDNA，并采用NanoDrop分光光度计（美国Thermo Scientific公司）测定mtDNA浓度。BV2细胞用GFP染料（美国Sigma公司）进行荧光标记。将40 ng mtDNA与2×10^5 BV2细胞一起孵育0、4、8、12、16 h，BV2细胞核用Hoechst 33342（上海碧云天生物技术有限公司）染色，并通过激光扫描共聚焦显微镜观察吞噬情况。

1.2.6 蛋白质印迹分析 将BV2细胞溶解在含有蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟的RIPA缓冲液（北京Solarbio公司）中。用BCA蛋白检测试剂盒（美国Thermo Fisher Scientific公司）测量蛋白浓度。将5倍样品缓冲液与蛋白质样品（1∶4）混合，通过10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）分离。转膜至聚偏二氟乙烯膜（美国Millipore公司）后，室温下用5%脱脂牛奶封闭膜1 h，然后又针对cGAS（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司）、NLRP3（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司）、裂解的半胱氨酸蛋白酶-1（Cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-1，Cleaved caspase-1）（1∶1 500，英国Abcam公司）、磷酸化核因子κB（phosphorylated nuclear factor kappa-B，p-NF-κB）（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司）、β-actin（1∶10 000，美国Cell Signaling Technology公司）一抗在4 ℃孵育过夜。在室温下与过氧化物酶偶联的第二抗体（1∶5 000，英国Abcam公司）孵育1 h后，通过ECL化学发光系统（美国Thermo Fisher公司）显影。

1.2.7 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA） 使用ELISA试剂盒（美国Thermo Fisher公司）测量BV2细胞培养上清液中细胞因子/趋化因子水平（IL-1β、IL-18、MCP-1和CXCL-10）。

1.2.8 流式细胞术 采用FAM-FLICA® Caspase-1（美国ImmunoChemistry Technologies公司）来鉴定细胞焦亡。Caspase-1和碘化丙锭（PI）双阳性细胞定义为典型焦亡细胞。

1.3 统计学方法

采用SPSS 25.0软件分析数据。所有连续变量进行正态分布和方差齐性检验。正态分布的计量资料采用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，非正态分布的计量资料用中位数（四分位间距）[M_d（P_{25}，P_{75}）]表示，组间比较采用t检验或非参数Mann-Whitney U检验。计数资料以频数和百分比表示，组间比较采用卡方检验或Fisher精确检验。采用Pearson相关分析评估相关性。对于体外实验数据，采用GraphPad Prism 9.5软件进行作图与分析。采用单因素方差分析评估组间差异。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 脓毒症患儿的人口统计学、流行病学和临床特征

26例患者纳入本研究，包括15例SAE患者和11例非SAE患者。所有患者在住院期间均未死亡。这些患者的人口统计学、流行病学和临床特征见表1。SAE组与非SAE组患者在性别、年龄、体质量、感染源、感染菌、合并症、脓毒症诊断标准和基线CRP、NSE、S100B水平方面差异均无统计学意义（P>0.05）。

2.2 脓毒症患儿在PICU住院前7 d的血清脑组织损伤生化标志物、mtDNA变化情况

SAE组与非SAE组患者在PICU住院前7 d的NSE、S100B随时间增加呈逐渐降低的趋势，并且非SAE组住院第7天的血清NSE、S100B水平明显低于住院第1天（t=3.394、3.329，P<0.05）（图1A）。在PICU住院前7 d，非SAE组患者血清mtDNA随时间增加呈逐渐降低的趋势，SAE组在住院第4天的血清mtDNA水平达到峰值，随后在住院第7天降

表1 脓毒症患儿的人口统计学、流行病学和临床特征[n,%;$\bar{x}\pm s$;M_d(P_{25},P_{75})]

项目	非SAE组(n=11)	SAE组(n=15)	$Z/t/\chi^2$值	P值
年龄(岁)	2.00(1.00,2.90)	2.00(1.10,2.60)	0.156	0.876
性别			0.454	0.500
男	3(27.3)	6(40.0)		
女	8(72.7)	9(60.0)		
体质量(kg)	10.30(8.50,13.00)	11.50(9.70,14.60)	1.273	0.203
感染源				
呼吸系统	4(36.4)	6(40.0)	0.035	0.851
皮肤病	1(9.1)	1(6.7)	0.053	0.819
胃肠道	0	1(6.7)	0.763	0.382
尿道	0	1(6.7)	0.763	0.382
合并症				
哮喘	3(27.3)	2(13.3)	0.794	0.373
先天性心脏缺陷	0	1(6.7)	0.763	0.382
皮肤黏膜疾病	0	1(6.7)	0.763	0.382
脓毒症诊断标准				
心动过速	11(100)	15(100)	-	1.000
呼吸急促	11(100)	15(100)	-	1.000
体温>38 ℃	8(72.7)	12(80.0)	0.189	0.664
白细胞数量增加	8(72.7)	12(80.0)	0.189	0.664
PICU住院时间(d)	19.00(15.00,28.00)	16.00(10.00,22.00)	1.222	0.222
感染菌			6.974	0.640
嗜血杆菌	1(9.1)	3(20.0)		
变形杆菌	0	1(6.7)		
腺病毒	0	1(6.7)		
大肠杆菌	0	1(6.7)		
甲型流感	1(9.1)	1(6.7)		
乙型流感	2(18.2)	1(6.7)		
草绿色链球菌	0	1(6.7)		
化脓性链球菌	1(9.1)	0		
表皮葡萄球菌	1(9.1)	0		
未知	5(45.5)	6(40.0)		
CRP(mg/L)	20.0(5.10,26.19)	30.0(4.85,32.68)	1.034	0.301
NSE(pg/mL)	4 305 ± 2 533	3 825 ± 1 773	0.570	0.574
S100B(pg/mL)	496 ± 242	572 ± 186	0.852	0.404

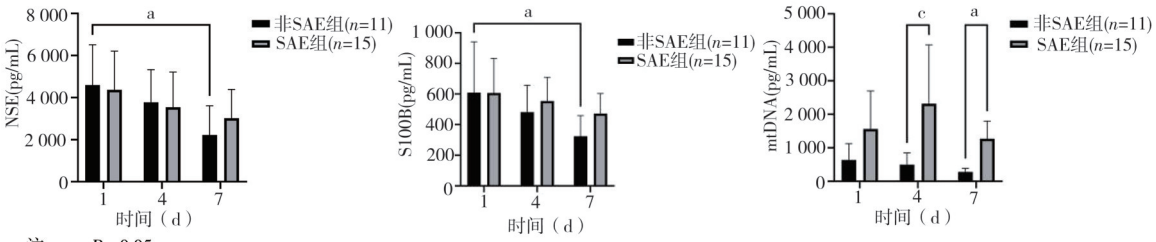
低，并且SAE组在住院第4、7天的血清mtDNA水平明显高于非SAE组(t=4.693、2.557，P<0.05)(图1A)。相关性分析显示，血清mtDNA水平与血清NSE、S100B水平呈正相关(第1天：r=0.692，第4天：r=0.393、0.498，第7天：r=0.408、0.522，均P<0.05)(图1B)。

2.3 LPS刺激HT22细胞释放mtDNA激活BV2细胞NF-κB/NLRP3信号通路

采用LPS刺激HT22细胞24 h，然后收集上清液分离mtDNA(用Cy5-dCTP标记，黄色)，将mtDNA处理BV2细胞(用GFP标记，绿色)。结果显示mtDNA-Cy5在刺激后4 h被BV2细胞吞噬，在mtDNA-Cy5与BV2细胞共培养12 h后达到高峰(图2)。此外，mtDNA在激活BV2细胞的NF-κB/NLRP3信号通路和诱导细胞释放炎症细胞因子/趋化因子(IL-1β、IL-18、MCP-1和CXCL-10)方面呈剂量依赖性(F=364.000、353.700、115.600、452.300，P<0.05)(图3)。

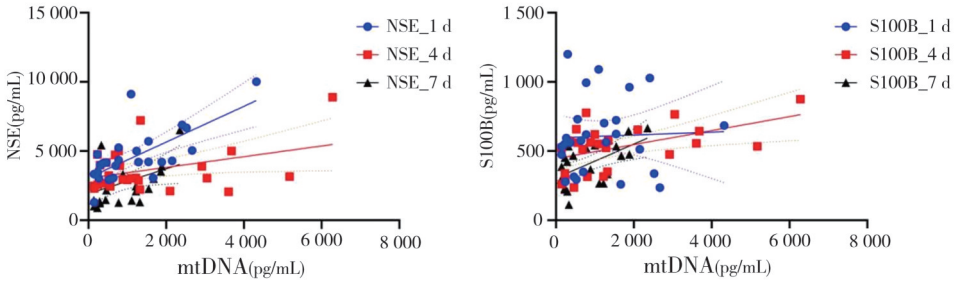
2.4 HT22细胞来源的mtDNA以cGAS依赖的方式促进BV2细胞NF-κB/NLRP3信号激活

采用si-cGAS在体外阻断mtDNA刺激后BV2细胞中cGAS的激活。与Con组相比，mtDNA组BV2细胞中cGAS、p-NF-κB、NLRP3、Cleaved caspase-1蛋白表达和IL-1β、IL-18、MCP-1、CXCL-10水平明显增加(t=44.760、33.160、32.730、16.550、44.920、30.860、28.060、38.010，P<0.05)。转



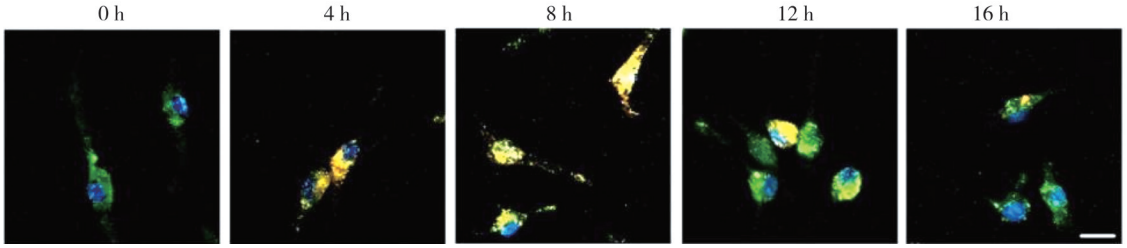
注：a，$P<0.05$

A. 血清NSE、S100B、mtDNA水平变化



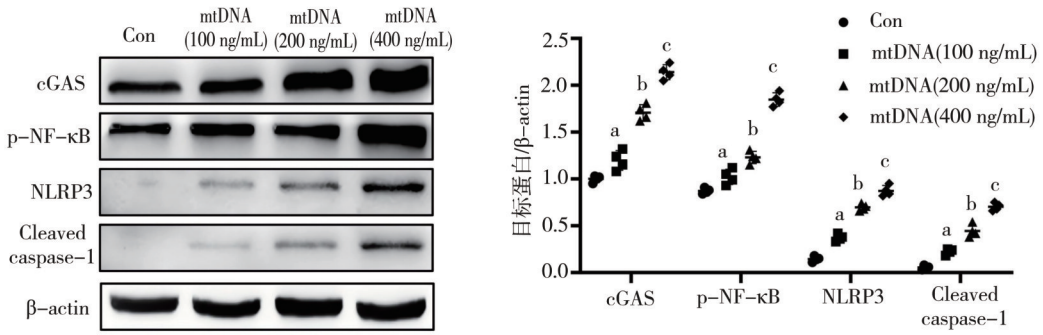
B. 不同时间点血清mtDNA水平与血清NSE、S100B水平的关系

图1　脓毒症患儿在PICU住院前7 d的血清脑组织损伤生化标志物、mtDNA变化情况

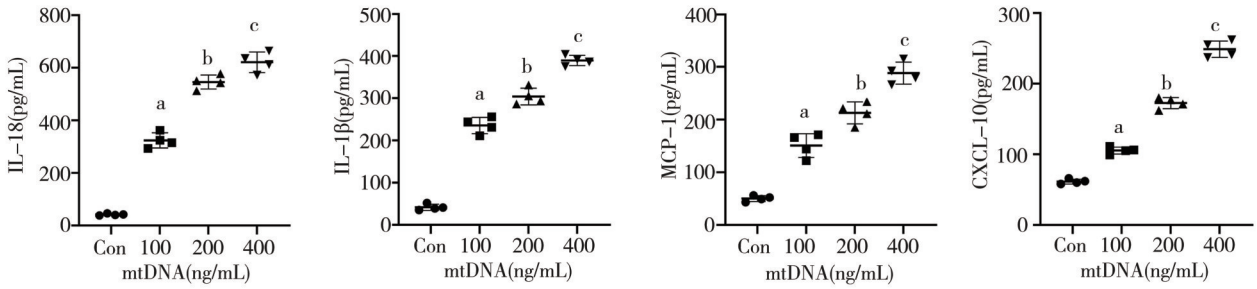


注：比例尺=20 μm

图2　免疫荧光显示不同刺激时间下BV2细胞对mtDNA-Cy5的吞噬情况



A. 蛋白质印迹分析BV2细胞中cGAS、p-NF-κB、β-actin、NLRP3、Cleaved caspase-1蛋白表达



B. ELISA测量上清液中的细胞因子/趋化因子表达水平（IL-1β、IL-18、MCP-1和CXCL-10）

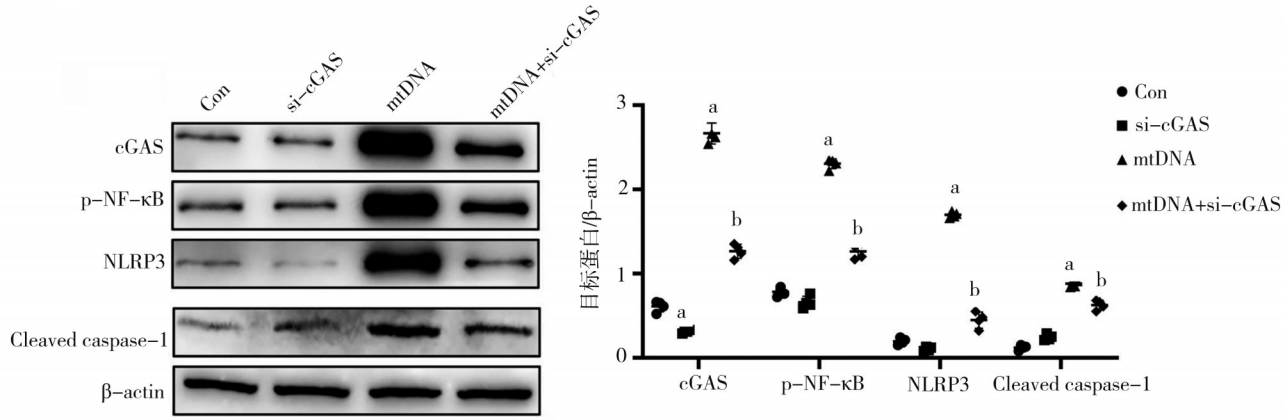
注：a，与Con组比较，$P<0.05$；b，与mtDNA（100 ng/mL）组比较，$P<0.05$；c，与mtDNA（200 ng/mL）组比较，$P<0.05$

图3　mtDNA剂量依赖地激活BV2细胞中cGAS介导的NF-κB/NLRP3信号（n=4）

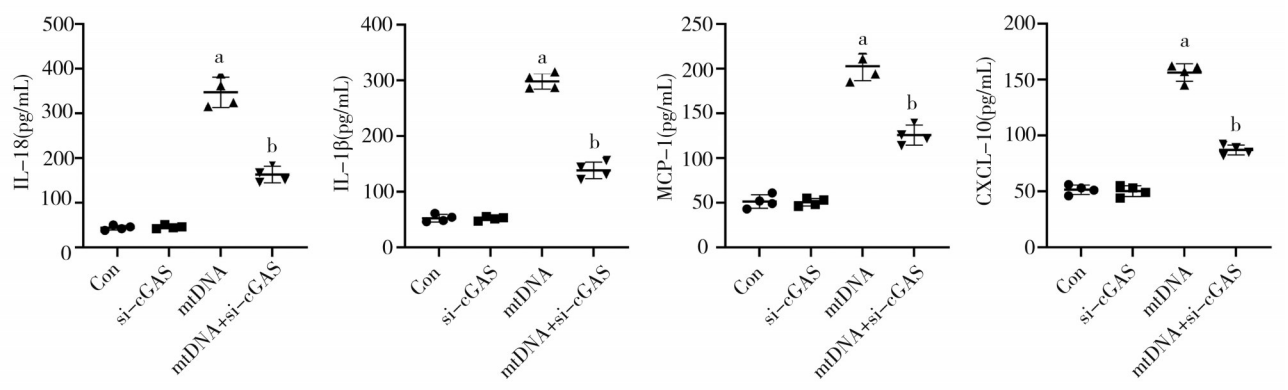
染 si-cGAS 明显逆转了 mtDNA 对 BV2 细胞 NF-κB/NLRP3 信号激活及 IL-1β、IL-18、MCP-1、CXCL-10 分泌的影响（t=30.500、22.710、22.730、5.555、29.220、18.730、14.260、25.130，P<0.05）（图 4）。流式细胞术分析显示，与 Con 组相比，mtDNA 组 BV2 细胞的焦亡率明显增加（t=39.620，P<0.05）。与 mtDNA 组相比，mtDNA+si-cGAS 组 BV2 细胞焦亡率明显降低（t=22.440，P<0.05）（图 5）。

2.5　阻断 caspase-1 激活减轻 cGAS 过表达在加重 mtDNA 诱导 BV2 细胞焦亡中的作用

采用 YVAD-cmk 阻断 BV2 细胞 caspase-1 激活。与 mtDNA 组相比，mtDNA+cGAS-oe 组 BV2 细胞中 cGAS、p-NF-κB、NLRP3、Cleaved caspase-1 蛋白表达，IL-1β、IL-18、MCP-1、CXCL-10 水平和细胞焦亡率明显增加（t=21.180、12.970、14.520、7.148、5.248、4.488、7.239、7.881、13.610，P<0.05）（图 6）。与 mtDNA+cGAS-oe 组相比，mtDNA+cGAS-oe+YVAD-cmk 组 BV2 细胞中 Cleaved caspase-1 蛋白表达，IL-1β、IL-18、MCP-1、CXCL-10 水平和细胞焦亡率明显降低（t=12.080、18.370、14.980、14.280、14.470、21.800，P<0.05）（图 6）。



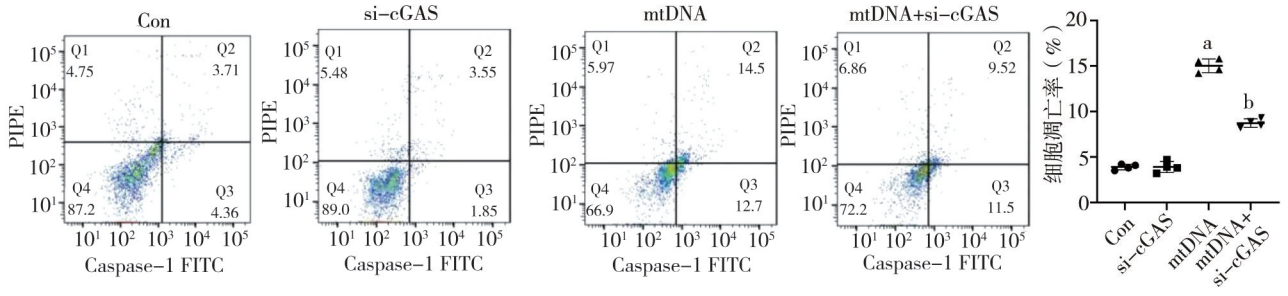
A. 蛋白质印迹分析BV2细胞中cGAS、p-NF-κB、β-actin、NLRP3、Cleaved caspase-1蛋白表达



B. 使用ELISA测量上清液中的细胞因子/趋化因子表达水平（IL-1β、IL-18、MCP-1和CXCL-10）

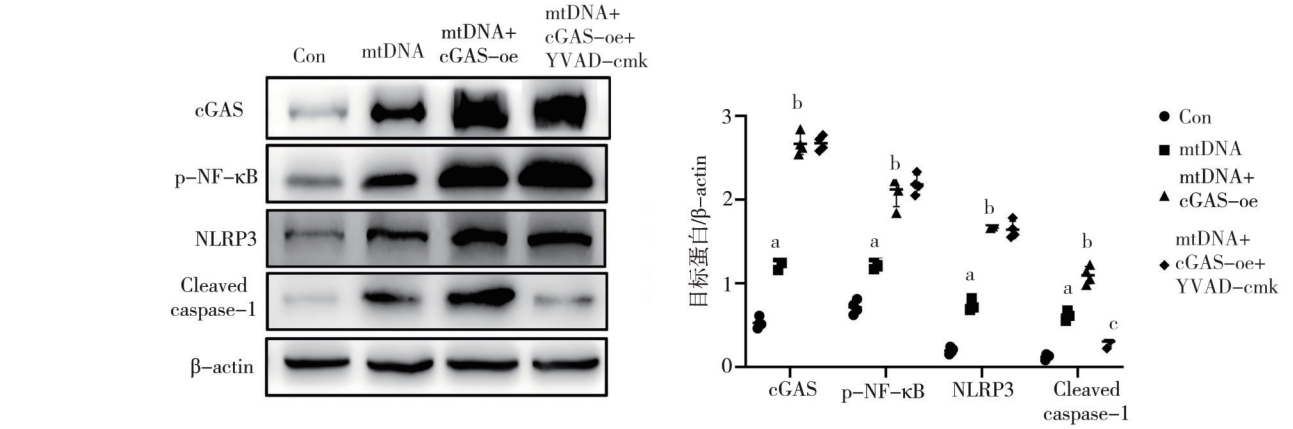
注：a，与 Con 组比较，P<0.05；b，与 mtDNA 组比较，P<0.05

图 4　HT22 细胞来源的 mtDNA 以 cGAS 依赖方式促进 BV2 细胞 NF-κB/NLRP3 信号激活（n=4）

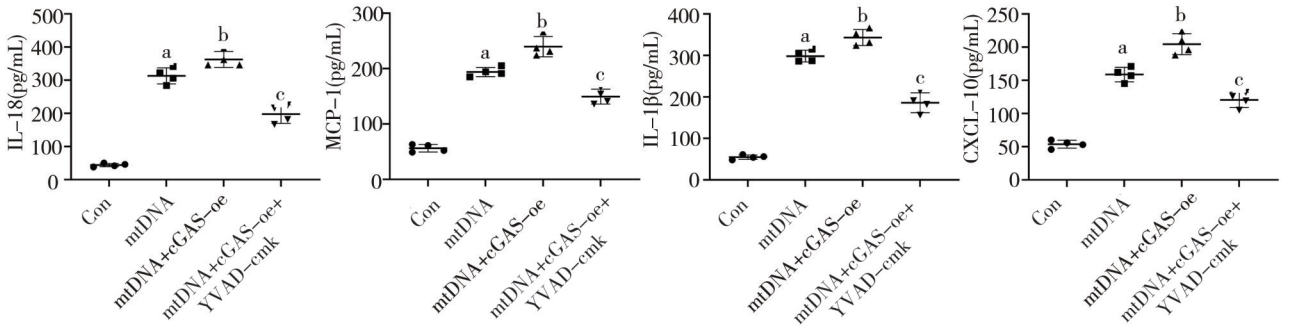


注：a，与 Con 组比较，P<0.05；b，与 mtDNA 组比较，P<0.05

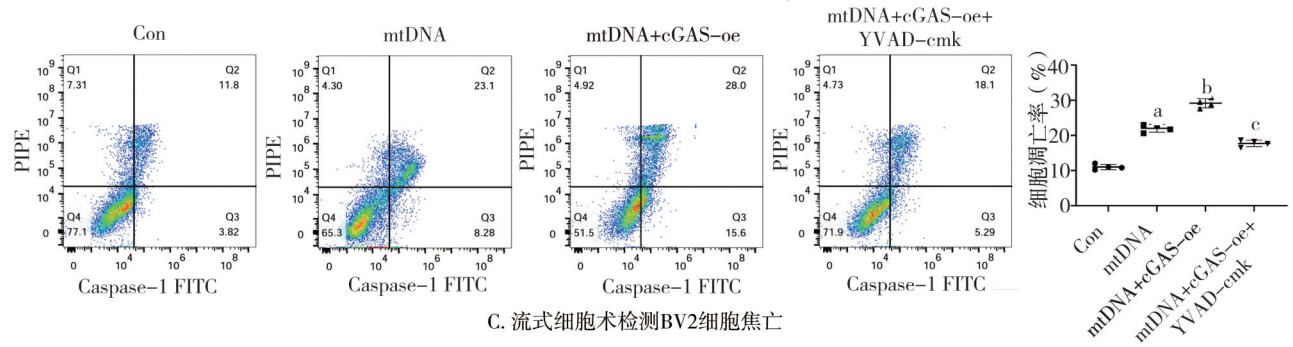
图 5　HT22 细胞来源的 mtDNA 以 cGAS 依赖方式促进 BV2 细胞焦亡（n=4）



A. 蛋白质印迹分析BV2细胞中cGAS、p-NF-κβ、β-actin、NLRP3、Cleaved caspase-1蛋白表达



B. ELISA测量上清液中的细胞因子/趋化因子表达水平（IL-1β、IL-18、MCP-1和CXCL-10）



C. 流式细胞术检测BV2细胞焦亡

注：a，与Con组比较，$P<0.05$；b，与mtDNA组比较，$P<0.05$；c，与mtDNA+cGAS-oe组比较，$P<0.05$

图6　阻断caspase-1激活减轻cGAS过表达在加重mtDNA诱导BV2细胞焦亡中的作用（$n=4$）

3　讨　论

SAE是脓毒症患儿最严重的并发症之一[11]。既往研究表明，在所有脓毒症患者中，SAE的发生率为8%~70%[12-13]。SAE可导致预后明显恶化，并且随着SAE严重程度的增加，脓毒症患者的死亡率明显增加，最高可达70%[14]。此外，存活的SAE患儿很可能会出现永久性神经认知障碍，明显降低生活质量，并给其家庭甚至社会带来沉重负担[15]。基于这些发现，SAE的早期识别与干预对于改善脓毒症患者尤其是患儿的预后和降低其死亡率至关重要。在这项研究中，脓毒症患儿的SAE发生率为57.7%（15/26），高于de Araújo BES等[16]报道的40%，主要原因是他们的研究将GCS≤12作为SAE诊断标准，本研究的SAE临床标准包括入院时GCS值<15或出现了明显的谵妄特征。此外，本研究发现SAE组患者在PICU住院前7 d的血清脑损伤生化标志物NSE、S100B水平变化不明显，而mtDNA水平则发生明显变化，并与NSE、S100B水平变化呈正相关。这项研究结果与Zhou GS等[17]报道的结果一致，在他们的研究中较高的mtDNA水平与器官功能障碍明显相关。1项针对成人脓毒症的研究表明，在诊断为脓毒症的患者中，mtDNA水平在第1天升高，并

持续到第5天[18]。mtDNA释放的机制包括胞质作用及随后的细胞外释放2个步骤。在前者中，线粒体内膜中的线粒体通透性转换孔起着关键作用，细胞应激和坏死是导致mtDNA释放的主要因素[19]。这些结果表明mtDNA可能是识别SAE患儿的重要生物标志物。然而，由于数据收集和实验过程中可能存在的偏倚，如样本量较小、血样收集时间点对结果的潜在影响。因此未来需要开展前瞻性研究验证本研究结论。

神经元是毒素和急性损伤最易攻击的目标之一，其损伤不仅是急性脑损伤的标志，而且还通过释放各种损伤相关分子模式（danger-associated molecular pattern，DAMP）激活神经内炎症反应。mtDNA作为非感染性炎症中先天免疫的重要介质，其拷贝数高，并在受损时形成大量的DAMP，刺激细胞质DNA诱导的免疫途径，引发免疫反应[20]。cGAS是最重要的DNA传感器之一，研究发现，cGAS定位于细胞核、线粒体和细胞膜中，与其信号特异性功能相关[21]。在体外和体内实验中，线粒体cGAS抑制癌细胞中的活性氧（reactive oxygen species，ROS）生成及细胞死亡，而从线粒体膜分离的cGAS增加ROS水平并促进癌细胞死亡[22]。这些发现表明cGAS主要识别mtDNA，并在细胞质中游离时激活下游通路。在正常情况下，mtDNA在线粒体中受到双膜的保护。氧化应激后，线粒体易发生变形，mtDNA在细胞质基质中定位错误，通过cGAS等蛋白质作为炎症诱导的中心，导致相应的细胞因子水平升高[23]。这与本研究的结果一致，在LPS模拟的体外SAE模型中，由HT22分泌的mtDNA可被BV2细胞吞噬，进而激活cGAS介导的NF-κB/NLRP3信号通路，诱发炎症反应，通过敲低BV2细胞的cGAS表达有助于逆转mtDNA诱导的炎症反应。异常激活的小胶质细胞通过产生多种促炎介质介导神经炎症反应，是中枢神经系统疾病的重要病理机制[24]。小胶质细胞类似于巨噬细胞，可以极化成不同的功能表型（M1和M2）[25]。其中，M1表型主要发挥促炎功能，可分泌促炎因子（如肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、白细胞介素6）介导神经炎症反应。因此，由受损神经元分泌的mtDNA增加可能以cGAS依赖性方式促进BV2细胞NF-κB/NLRP3信号激活，进而参与SAE的病理机制。

此外，本研究发现mtDNA以cGAS依赖性方式促进BV2细胞焦亡。细胞焦亡是炎症相关的程序性细胞死亡的一种形式，最初被确定为涉及胱天蛋白酶家族的巨噬细胞死亡途径，此后在各种类型细胞中观察到细胞焦亡，这种细胞死亡由炎症性胱天蛋白酶（如Caspase-1）驱动，导致gasdermin D的切割，形成细胞膜孔洞，最终导致细胞裂解并释放促炎细胞因子如白细胞介素1β和白细胞介素18[5]。研究表明，细胞焦亡可促进SAE进展，部分药物通过抑制细胞焦亡相关的信号通路对SAE具有保护作用[26]。为明确细胞焦亡在调节mtDNA细胞外释放中的功能重要性，本研究采用YVAD-cmk阻断caspase-1激活和随后的BV2细胞焦亡，结果显示阻断caspase-1激活减轻cGAS过表达在加重mtDNA诱导BV2细胞炎症反应中的作用。NLRP3是一种重要的细胞质模式识别受体，其激活导致gasdermin D被胱天蛋白酶切割，引发细胞焦亡和随后的病理生理反应[27]。然而，目前关于连接mtDNA-cGAS信号轴和NLRP3-细胞焦亡轴的分子调节机制需要进一步研究。根据目前的结果推测，在脓毒症的早期阶段，受损的神经元细胞释放DNA，激活小胶质细胞的cGAS信号通路，从而引发局部炎症。随着脓毒症的发展，小胶质细胞的激活加剧了局部炎症的扩散，促进了炎症级联和氧化应激，诱发细胞因子风暴，进一步加剧了神经元损伤[28]。因此，未来的研究需阐明mtDNA-cGAS轴和NLRP3-细胞焦亡轴之间的相互作用，及二者在调节小胶质细胞焦亡和减轻SAE神经组织损伤中的作用。

总之，本研究揭示了脓毒症患儿血清mtDNA水平与血清NSE、S100B水平变化密切相关，并且可能是识别SAE患儿的重要生物标志物。体外研究证实了受损神经元分泌的mtDNA增加可能以cGAS依赖方式促进BV2细胞NF-κB/NLRP3信号激活及焦亡，进而参与SAE的病理机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 邢静：研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写；王艳飞：数据收集；闫慧娟、王新梅：实验技术指导；刘振奎：研究方案设计、论文修改

参 考 文 献

[1] Balamuth F，Scott HF，Weiss SL，et al. Validation of the pediatric sequential organ failure assessment score and evaluation of third international consensus definitions for sepsis and septic shock definitions in

the pediatric emergency department[J]. JAMA Pediatr, 2022, 176(7): 672-678.

[2] Tauber SC, Djukic M, Gossner J, et al. Sepsis-associated encephalopathy and septic encephalitis: an update[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2021, 19(2): 215-231.

[3] Ren C, Yao RQ, Zhang H, et al. Sepsis-associated encephalopathy: a vicious cycle of immunosuppression[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 14.

[4] Bircak-Kuchtova B, Chung HY, Wickel J, et al. Neurofilament light chains to assess sepsis-associated encephalopathy: are we on the track toward clinical implementation?[J]. Crit Care, 2023, 27(1): 214.

[5] Yu P, Zhang X, Liu N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128.

[6] Gu F, Wang ZQ, Ding HJ, et al. Microglial mitochondrial DNA release contributes to neuroinflammation after intracerebral hemorrhage through activating AIM2 inflammasome[J]. Exp Neurol, 2024, 382: 114950.

[7] Yan HP, Li M, Lu XL, et al. Use of plasma mitochondrial DNA levels for determining disease severity and prognosis in pediatric sepsis: a case control study[J]. BMC Pediatr, 2018, 18(1): 267.

[8] Ahmad FM, A Al-Binni M, Bani Hani A, et al. Complement terminal pathway activation is associated with organ failure in sepsis patients [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 153-162.

[9] Wang G, Gao Y, Fu YN, et al. A simple nomogram for predicting the mortality of PICU patients with sepsis-associated encephalopathy: a multicenter retrospective study[J]. Front Neurol, 2024, 15: 1418405.

[10] Pei HY, Zeng JN, He ZM, et al. Palmatine ameliorates LPS-induced HT-22 cells and mouse models of depression by regulating apoptosis and oxidative stress[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37(1): e23225.

[11] Xin YW, Tian M, Deng SX, et al. The key drivers of brain injury by systemic inflammatory responses after sepsis: microglia and neuroinflammation[J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(3): 1369-1390.

[12] Wang G, Jiang XZ, Fu YN, et al. Development and validation of a nomogram to predict the risk of sepsis-associated encephalopathy for septic patients in PICU: a multicenter retrospective cohort study[J]. J Intensive Care, 2024, 12(1): 8.

[13] Luo HL, Li G, Yang BX, et al. Association between the first 24 hours $PaCO_2$ and all-cause mortality of patients suffering from sepsis-associated encephalopathy after ICU admission: a retrospective study[J]. PLoS One, 2023, 18(10): e0293256.

[14] Chen YH, Hu Y, Li XF, et al. Clinical features and factors associated with sepsis-associated encephalopathy in children: retrospective single-center clinical study[J]. Front Neurol, 2022, 13: 838746.

[15] Sankar J, Agarwal S, Goyal A, et al. Pediatric sepsis phenotypes and outcome: 5-year retrospective cohort study in a single center in India (2017-2022)[J]. Pediatr Crit Care Med, 2024, 25(4): e186-e192.

[16] de Araújo BES, da Silva Fontana R, de Magalhães-Barbosa MC, et al. Clinical features, electroencephalogram, and biomarkers in pediatric sepsis-associated encephalopathy[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 10673.

[17] Zhou GS, Liu JJ, Zhang HM, et al. Circulating mitochondrial DNA levels are associated with early diagnosis and prognosis in patients with sepsis[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(23): 2883-2885.

[18] Bhagirath VC, Dwivedi DJ, Liaw PC. Comparison of the proinflammatory and procoagulant properties of nuclear, mitochondrial, and bacterial DNA[J]. Shock, 2015, 44(3): 265-271.

[19] Marchi S, Guilbaud E, Tait SWG, et al. Mitochondrial control of inflammation[J]. Nat Rev Immunol, 2023, 23(3): 159-173.

[20] Xian HX, Karin M. Oxidized mitochondrial DNA: a protective signal gone awry[J]. Trends Immunol, 2023, 44(3): 188-200.

[21] Zohny SM, Habib MZ, Mohamad MI, et al. Memantine/aripiprazole combination alleviates cognitive dysfunction in valproic acid rat model of autism: hippocampal CREB/BDNF signaling and glutamate homeostasis[J]. Neurotherapeutics, 2023, 20(2): 464-483.

[22] Qiu SQ, Zhong XY, Meng X, et al. Mitochondria-localized cGAS suppresses ferroptosis to promote cancer progression[J]. Cell Res, 2023, 33(4): 299-311.

[23] Irazoki A, Gordaliza-Alaguero I, Frank E, et al. Disruption of mitochondrial dynamics triggers muscle inflammation through interorganellar contacts and mitochondrial DNA mislocation[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 108.

[24] Xu YX, Li YJ, Wang CQ, et al. The reciprocal interactions between microglia and T cells in Parkinson's disease: a double-edged sword[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 33.

[25] Jin ZQ, Lu J, Xu HY, et al. Exploring the correlation between innate immune activation of inflammasome and regulation of pyroptosis after intracerebral hemorrhage: from mechanism to treatment[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 179: 117382.

[26] Zhong XL, Chen ZY, Wang YJ, et al. JQ1 attenuates neuroinflammation by inhibiting the inflammasome-dependent canonical pyroptosis pathway in SAE[J]. Brain Res Bull, 2022, 189: 174-183.

[27] Huang XL, Ye CZ, Zhao XY, et al. TRIM45 aggravates microglia pyroptosis *via* Atg5/NLRP3 axis in septic encephalopathy[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 284.

[28] Sun JJ, Fleishman JS, Liu XY, et al. Targeting novel regulated cell death: ferroptosis, pyroptosis, and autophagy in sepsis-associated encephalopathy[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116453.

（收稿：2024-12-18；修回：2025-03-04；录用：2025-03-10）

（责任编辑：曾　玲）

本文引用格式：

邢　静，王艳飞，闫慧娟，等. 儿童脓毒症胶质细胞焦亡信号活化及其对神经细胞线粒体损伤的影响力[J]. 重庆医科大学学报，2026，51(6)：829-837.