

氧糖剥夺/恢复对A549肺泡上皮细胞焦亡的影响

王小燕 肖宗懿 易寒 安雨轩 宋娟 陈菲 王寿勇*

(重庆医科大学附属儿童医院麻醉科, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 通过建立A549肺泡上皮细胞氧糖剥夺/恢复(oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R)模型, 模拟临床体外循环中肺泡上皮细胞缺血-再灌注过程, 观察OGD/R是否引发A549细胞焦亡, 为进一步探讨CPB相关肺损伤发生机制提供参考。采用RT-qPCR法和Western blot法检测焦亡相关基因Caspase1、ASC、NLRP3、GSDMD的mRNA转录和蛋白质表达水平, 并进一步观察Caspase1特异性拮抗剂VX-765对Caspase1、焦亡效应蛋白GSDMD、培养上清液中Caspase1焦亡效应产物IL-1 β 、IL-18表达水平以及细胞存活率的影响。结果显示与对照组相比, OGD/R后A549细胞Caspase1活性增高($P<0.05$), 焦亡相关基因Caspase1、ASC、NLRP3、GSDMD的mRNA和蛋白质表达均上调($P<0.05$); 采用拮抗剂VX-765预处理后, 细胞焦亡相关蛋白Caspase1、GSDMD表达量明显减少($P<0.05$), 细胞培养上清液中焦亡标志产物细胞因子IL-1 β 、IL-18水平显著下降($P<0.05$), 细胞存活率得到恢复。该研究表明, 氧糖剥夺/恢复可诱导A549肺泡上皮细胞发生焦亡, 抑制细胞焦亡的发生对氧糖剥夺/恢复细胞模型具有保护作用。

关键词 氧糖剥夺; 焦亡; A549肺泡上皮细胞; VX-765

Effects of Oxygen-Glucose Deprivation/Recovery on Pyroptosis of A549 Alveolar Epithelial Cells

WANG Xiaoyan, XIAO Zongyi, YI Han, AN Yuxuan, SONG Juan, CHEN Fei, WANG Shouyong*

(Department of Anesthesiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Abstract To further explore the mechanisms of cardiopulmonary bypass-related acute lung injury, an OGD/R (oxygen-glucose deprivation/recovery) model using A549 alveolar epithelial cell has been established to simulate the ischemia-reperfusion process of alveolar epithelial cell during clinical cardiopulmonary bypass. The pyroptosis of A549 cell caused by OGD/R was observed. The mRNA and protein expression levels of pyroptosis related gene Caspase1, ASC, NLRP3, GSDMD were detected by RT-qPCR and Western blot. Then the effects of Caspase1 inhibitor VX-765 on Caspase1 and GSDMD expression, the A549 cell survival rate, as well as the concentrations of IL-1 β and IL-18 in cell culture supernatant were measured, respectively. The results showed that OGD/R induced an significant increase in Caspase1 activity ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of pyroptosis-related gene Caspase1, ASC, NLRP3, GSDMD were up-regulated significantly ($P<0.05$). When

收稿日期: 2020-07-22 接受日期: 2020-09-08

重庆市卫生计生委医学科研项目(批准号: 2015MSXMO40)和国家自然科学基金(批准号: 30700785)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63632143, E-mail: saulwang@126.com

Received: July 22, 2020 Accepted: September 8, 2020

This work was supported by the Project of Chongqing Medical and Health Program Medical Research Commission (Grant No.2015MSXMO40) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30700785)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63632143, E-mail: saulwang@126.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5382>

pretreatment with the Caspase1 inhibitor VX-765, the Caspase1 and GSDMD expression levels, the concentration of IL-1 β and IL-18 in cell culture supernatant were decreased, and the A549 cell survival rate after OGD/R was restored. This study suggests that OGD/R induces A549 alveolar epithelial cell pyroptosis, and inhibition of the occurrence of pyroptosis has a protective effect on OGD/R cell model, which may be involved in the mechanisms of cardiopulmonary bypass-related lung injury.

Keywords oxygen-glucose deprivation; pyroptosis; A549 alveolar epithelial cells; VX-765

在大型心脏外科手术中,急性肺损伤是体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)心内直视手术的严重并发症,它常继发于肺缺血-再灌注和全身性炎症反应综合征的基础之上,肺泡上皮细胞结构功能的破坏是其主要机制^[1]。细胞焦亡是一种依赖于炎性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)的程序性死亡方式,常伴随强烈的炎性因子释放^[2]。研究表明,模拟缺血-再灌注过程的氧糖剥夺实验可诱发鼠肺泡巨噬细胞焦亡而导致肺损伤发生^[3]。CPB过程中,肺缺血-再灌注是否会通过诱发肺泡上皮细胞焦亡尚不清楚,本研究拟以体外培养的A549肺泡上皮细胞为研究对象,通过建立氧糖剥夺/恢复(oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R)细胞损伤模型来模拟体外循环中肺泡上皮细胞缺血-再灌注过程,探讨OGD/R对A549肺泡上皮细胞焦亡的影响,为进一步探讨CPB相关肺损伤发生机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

人A549肺泡上皮细胞细胞株,由重庆医科大学附属儿童医院儿科研究中心实验室保存。高糖DMEM培养基购自Gibco公司;无糖DMEM培养基购自迈晨科技有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;MTT试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;Caspase1试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR逆转录试剂盒、实时荧光定量试剂盒购自MedChemExpress有限公司;引物购自上海生工生物工程股份有限公司;Caspase1拮抗剂VX-765购自美国APEX BIO公司;全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测量试剂盒购自江苏凯基生物技术有限公司;兔多克隆Caspase1、ASC、NLRP3、GSDMD抗体、鼠单克隆GAPDH抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;人来源细胞因子IL-18、IL-1 β ELISA试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。

1.2 主要方法

1.2.1 预实验筛选 A549 细胞氧糖剥夺/恢复时间

采用完全培养基(含10%胎牛血清的高糖DMEM)培养A549细胞,2天更换一次培养液,生长至对数期时分别给予1~6 h氧糖剥夺(无糖无血清培养基、37 °C、1% O₂)处理,然后更换培养基氧糖恢复培养6 h(完全培养基、37 °C、21% O₂),每组设置平行空白对照。采用MTT法测定细胞存活率,结果发现在氧糖剥夺6 h时,细胞存活率较空白对照出现明显下降,因此确定本研究后续OGD/R条件为氧糖剥夺6 h、恢复6 h。

1.2.2 氧糖剥夺/恢复对A549细胞焦亡相关基因和蛋白表达水平的影响

取生长良好的A549培养细胞,将其分为2组,分别为OGD/R组和对照组,每组每项观察指标设3个复孔。OGD/R组按照上述预实验筛选条件处理,对照组仅在平行时间点给予更换完全培养基的操作,不实施氧糖剥夺/恢复处理。处理结束后,测定各细胞样品Caspase1活性,焦亡相关蛋白Caspase1、炎性蛋白NLRP3(NLR pyrin domain containing 3)、连接蛋白ASC(apoptosis-associated speck-like protein contain a CARD)、效应蛋白GSDMD(gasdermin-D)的转录及翻译水平。

1.2.3 Caspase1活性测定 采用Caspase1活性测定试剂盒进行,实验步骤严格按照说明书进行,具体操作如下:实验处理结束后,收集各组细胞及培养液,600 r/min离心5 min,加入PBS重悬并再次离心收集细胞沉淀,每2 $\times$ 10⁶个细胞加入100 μ L裂解液,冰上裂解15 min,用BCA法测定蛋白浓度。根据说明书配制反应体系,加入10 μ L Ac-YVAD-pNA(2 mmol/L),37 °C孵育120 min,用酶标仪测定溶液吸光度(D_{405})值。样品中Caspase1催化产生的pNA产生的吸光度为样品的 D_{405} 减去空白对照的 D_{405} ,根据pNA的标准曲线可得到Caspase1活性值,全程注意操作轻柔避免产生气泡影响结果。

1.2.4 RT-qPCR测量细胞焦亡相关基因表达水平 实验处理结束后,去除A549细胞上清液,加入1 mL TRIzol裂解细胞3 min,将细胞吹打转移至EP管,冰上裂解10 min。加入200 μ L氯仿颠倒混匀,4 °C、

表1 引物序列
Table 1 Sequences of the primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	引物长度/bp Primer length /bp
<i>Caspase1</i>	Forward: 5'-GAA CCT CGA GCT GAT CTT CG-3'	96
	Reverse: 5'-CTG AGC TCC GAT TCG AAG G-3'	
<i>ASC</i>	Forward: 5'-GCC CAC CAA CCC AAG CAA GAT G-3'	129
	Reverse: 5'-CTC CGC TCC AGG TCC TCC AC-3'	
<i>NLRP3</i>	Forward: 5'-TGT CGG GAG GTG AGC CTT GTG-3'	90
	Reverse: 5'-GAT CTT GTG GAT GGG TGG GTT TGG-3'	
<i>GSDMD</i>	Forward: 5'-GCC TCC ACA ACT TCC TGA CAG ATG-3'	86
	Reverse: 5'-GGT CTC CAC CTC TGC CCG TAG-3'	

14 400 r/min离心15 min。吸取水相层至新的EP管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,4℃、14 400 r/min,离心10 min后收集白色RNA沉淀。加入40 μL DEPC水溶解RNA沉淀,按照逆转录试剂盒说明书合成cDNA,逆转录条件设定为25℃ 2 min,42℃ 45 min,85℃ 2 min。采用实时荧光定量PCR法测定焦亡相关基因*Caspase1*、*ASC*、*NLRP3*、*GSDMD*的表达水平,反应条件为:95℃ 15 min;95℃ 10 s、60℃ 32 s,共40个循环,各引物序列见表1。目的基因表达水平使用2^{-ΔΔCt}法分析,以β-actin为内参。

1.2.5 Western blot检测焦亡相关蛋白表达水平 实验处理结束后收集细胞及培养液,1 000×g离心5 min去除上清液,加入PBS重悬细胞,再次离心收集细胞沉淀。加入细胞裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂和PMSF后超声15 min提取细胞全蛋白并采用BCA蛋白试剂盒检测蛋白浓度,按照蛋白浓度4:1的比例加入适量的蛋白上样缓冲液,煮沸10 min使其变性。以20 μg(其中GSDMD蛋白上样量为30 μg)蛋白上样量行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳条件为60 V、30 min,120 V、60 min。电泳结束后在110 V、120 min条件下转PVDF膜。TBST洗涤5次,每次4 min。用5%脱脂牛奶室温封闭90 min后,洗膜后加入特异性一抗,4℃孵育过夜,再次TBST洗膜5次,每次4 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育120 min,TBST洗涤5次,每次4 min。ECL曝光显影,以GAPDH为内参,结果采用Image Lab 5.1软件进行分析。

1.2.6 细胞焦亡Caspase1特异性拮抗剂VX-765对OGD/R细胞焦亡的影响 取生长良好的A549培养细胞,分为3组,分别为氧糖剥夺/恢复组(OGD/R)、拮抗剂组(OGD/R+VX-765)和对照组(Control),每组每项观察指标设3个复孔。OGD/R组按照上述预实验

筛选条件处理,拮抗剂组在实施氧糖剥夺前预先用含Caspase1抑制剂VX-765(50 μmol/L)的培养液孵育3 h,对照组仅在平行时间点进行更换完全培养基操作,不实施氧糖剥夺/恢复等处理。处理结束后,采用Western blot法测定各细胞样品焦亡相关蛋白Caspase1及下游效应蛋白GSDMD表达水平,采用MTT法测量各组细胞活性,采用ELISA法测定细胞培养上清中细胞焦亡效应物IL-1β和IL-18水平。ELISA方法严格按照试剂盒说明书进行,蛋白质表达测定方法同上。

1.3 统计学处理 采用SPSS 24.0统计软件进行统计学分析,Graph-Pad prism 8.0绘图。该研究样本均为计量资料,采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数差异比较采用独立样本t检验;多组间均数差异比较先采用单因素单因素方差分析,然后采用Bonferroni法进行两两比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 预试验筛选A549细胞氧糖剥夺/恢复时间

随着氧糖剥夺时间的延长,OGD/R组细胞存活率呈逐渐下降趋势,其平行对照组细胞呈正常增殖趋势,至6 h时细胞存活率下降趋势明显,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)(图1)。

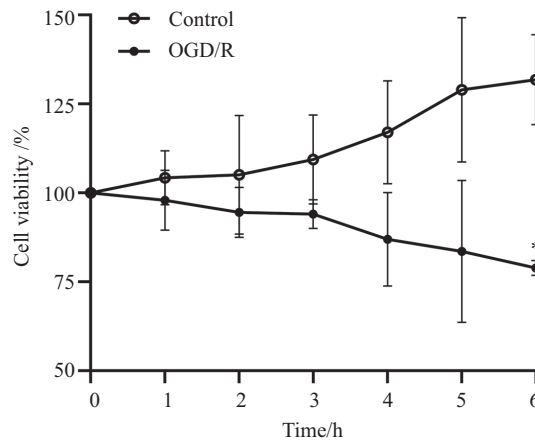
2.2 OGD/R对细胞焦亡相关基因和蛋白表达的影响

经实验处理后,OGD/R组和对照组Caspase1可催化pNA活性分别为(230.00±7.63) μmol/L和(140.53±13.79) μmol/L,OGD/R组升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)(图2A);RT-qPCR结果显示,OGD/R组细胞焦亡相关基因*Caspase1*、*ASC*、*NLRP3*、

GSDMD的mRNA相对表达量为 1.69 ± 0.16 、 1.70 ± 0.07 、 1.89 ± 0.14 、 1.78 ± 0.24 , 与对照组相比表达量显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$)(图2B); Western blot检测显示, OGD/R组的Caspase1、ASC、NLRP3、GSDMD的蛋白相对表达量分别为 1.96 ± 0.01 、 1.32 ± 0.01 、 1.19 ± 0.00 和 1.22 ± 0.04 , 较对照组明显上调, 差异具有统计学意义($P<0.05$)(图2C和图2D)。

2.3 VX-765逆转了OGD/R诱导的Caspase1依赖的A549细胞焦亡

Western blot检测结果显示, 对照组、OGD/R组、抑制剂组Caspase1蛋白表达水平相对表达量分别为 1.00 ± 0.12 、 1.68 ± 0.06 、 1.15 ± 0.16 , GSDMD蛋白表达水平相对表达量为 1.00 ± 0.08 、 1.28 ± 0.07 、 0.11 ± 0.07 , 与对照组相比OGD/R组Caspase1、GSDMD蛋白表

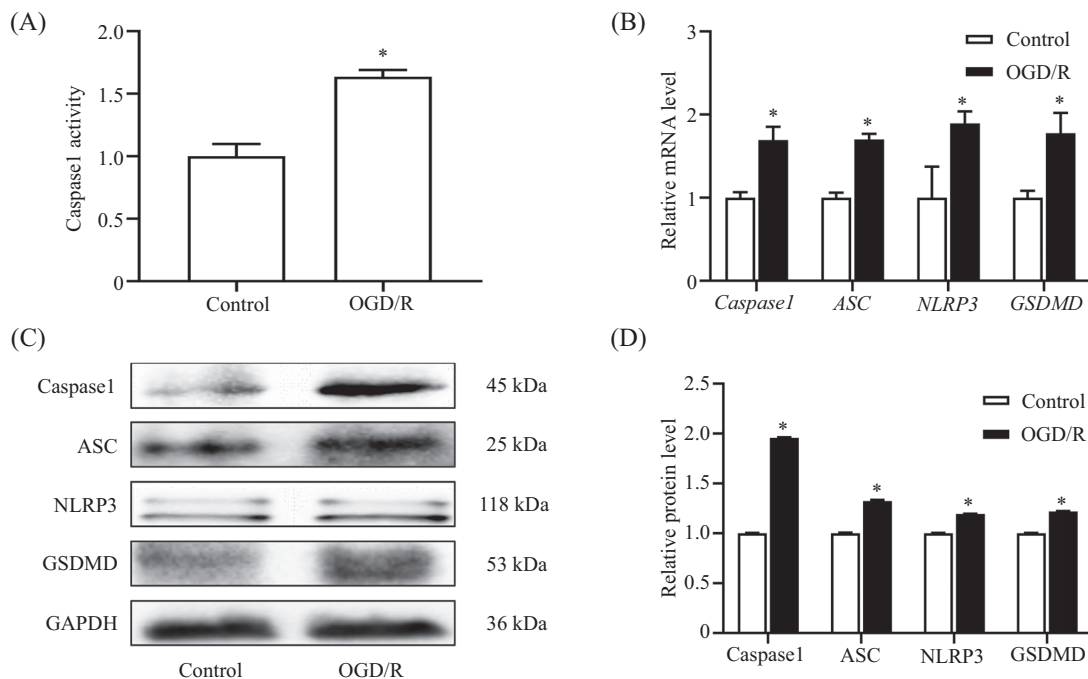


MTT法检测细胞氧糖剥夺1~6 h/恢复6 h的细胞活力值。n=3, * $P<0.05$ 。

Cell viability detected by MTT after OGD (1-6 h)/R (6 h). n=3, * $P<0.05$.

图1 OGD时间对A549细胞活力的影响

Fig.1 Effect of OGD time on the cell viability of A549 cells

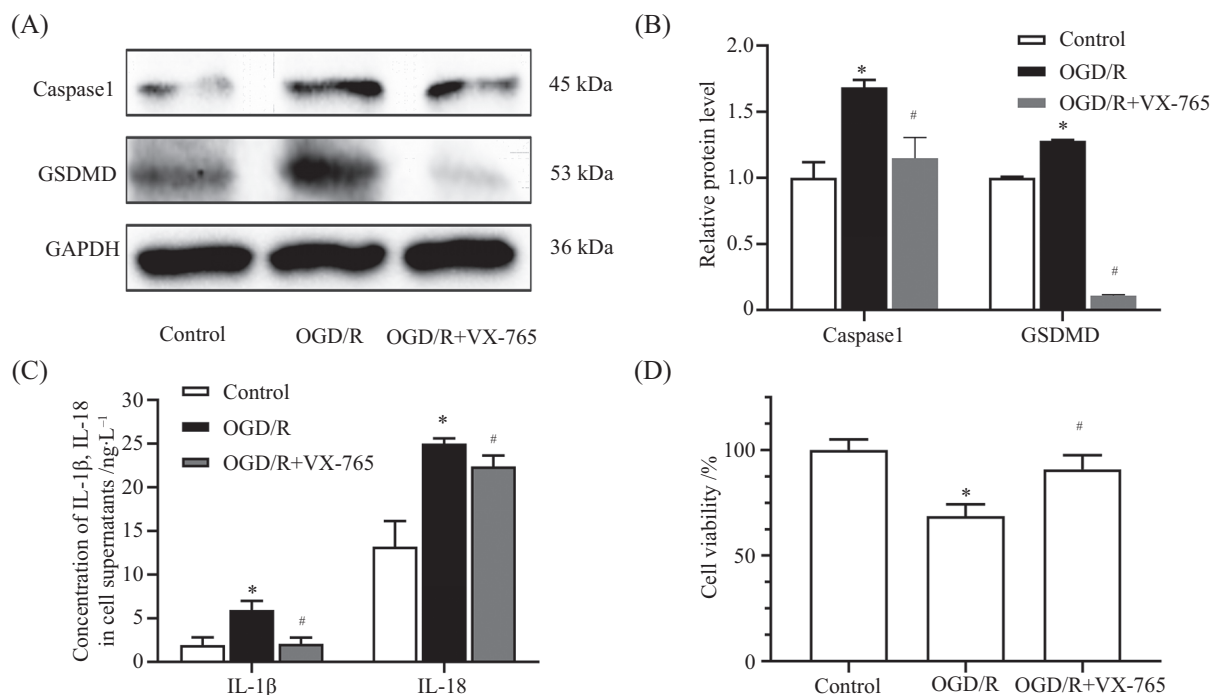


A: Caspase1试剂盒检测细胞氧糖剥夺/恢复后Caspase1活力值结果; B: RT-qPCR检测细胞氧糖剥夺/恢复后焦亡相关基因表达水平; C、D: Western blot检测细胞氧糖剥夺/恢复后焦亡蛋白表达水平。n=3, * $P<0.05$, 与对照组相比。

A: the result of Caspase1 kit after OGD/R; B: the expression level of mRNA detected by RT-qPCR after OGD/R; C,D: the expression level of protein detected by Western blot after OGD/R. n=3, * $P<0.05$ vs control group.

图2 氧糖剥夺对A549细胞焦亡相关基因蛋白水平的影响

Fig.2 Effects of OGD/R on the expression levels of pyroptosis-related genes and proteins in A549 cells



A、B: Western blot检测VX-765预处理后细胞焦亡蛋白Caspase1和GSDMD表达水平; C: ELISA试剂盒检测OGD/R组和VX-765组细胞上清液中细胞因子IL-18、IL-1β表达量; D: MTT法检测OGD/R组和VX-765组后细胞存活率改变。 $n=3$, * $P<0.05$ 与对照组相比, # $P<0.05$, 与OGD/R组相比。A,B: the expression levels of Caspase1 and GSDMD proteins detected by Western blot in OGD/R group and VX-765 group; C: the expression levels of cytokines IL-18 and IL-1β in cell supernatant detected by ELISA kit in OGD/R group and VX-765 group; D: cell viability detected by MTT in OGD/R group and VX-765 group. $n=3$, * $P<0.05$ vs control group, # $P<0.05$ vs OGD/R group.

图3 VX-765对OGD/R后A549细胞存活率和焦亡蛋白的影响

Fig.3 Effects of VX-765 on the survival rate and expression levels of pyroptosis-related proteins in A549 cells after OGD/R

达升高($P<0.05$), 使用抑制剂VX-765后, Caspase1、GSDMD蛋白表达较OGD/R组显著降低($P<0.05$)(图3A和图3B); ELISA检测对照组、OGD/R组、OGD/R+VX-765组上清液中细胞因子IL-18表达量分别为(13.21 ± 2.92)、(25 ± 0.62)、(22.38 ± 1.25) ng/L, 细胞因子IL-1β表达量分别为(1.93 ± 0.89)、(5.95 ± 1.04)、(2.09 ± 0.69) ng/L, 与对照组相比, OGD/R组细胞上清液IL-1β和IL-18均显著升高($P<0.05$), 而使用抑制剂后, 两种细胞因子均降低, 但IL-18水平仍高于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$)(图3C); MTT法检测各组细胞的存活率显示, OGD/R组细胞存活率为(68.66 ± 5.68)%, 显著低于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 使用抑制剂VX-765后, 细胞存活率得到恢复(图3D)。

3 讨论

本研究发现, 氧糖剥夺/恢复处理后, A549肺泡上皮细胞焦亡相关基因和蛋白质表达上调, 表明氧糖剥夺/恢复处理可能导致细胞焦亡的发生。对细胞焦亡关键环节Caspase1给予特异性抑制剂VX-765

处理后, 细胞焦亡相关蛋白Caspase1、GSDMD表达降低, 细胞培养上清中焦亡标志产物IL-1β和IL-18水平下降, 细胞活性恢复, 表明抑制焦亡发生可以缓解氧糖剥夺/恢复对A549肺泡上皮细胞的伤害。这些研究结果提示, 肺泡上皮细胞焦亡可能参与了体外循环导致肺损伤的发生机制。

研究表明, 体外循环阻断期间, 肺脏血液供应仅剩余支气管循环, 为正常肺循环血量的5%左右(先天性心脏病侧支循环除外)^[4]。肺脏缺血-再灌注过程是心脏直视手术中体外循环所导致的最显著非生理状态, 也是体外循环相关性肺损伤最主要的原因之一。因此, 本研究借鉴同类文献[3], 采用A549肺泡上皮细胞氧糖剥夺/恢复模型来模拟体外循环过程中肺泡上皮细胞的缺血-再灌注过程。

细胞焦亡是一种炎性半胱氨酸蛋白酶依赖性的细胞程序性死亡, 它由胞内模式识别受体启动信号转导, 通过衔接蛋白ASC的Pyrin和CARD结构域招募NLRP3等炎性蛋白和Caspase1效应前体, 形成NLRP3炎性小体^[5], 从而引起Caspase1活化, 后者通

过催化GSDMD蛋白和IL-1 β 、IL-18前体裂解,分别引起胞膜完整性破坏和IL-1 β 、IL-18活化和释放,伴随着炎症反应是细胞发生焦亡的显著特征^[6]。本研究,OGD/R处理后,细胞焦亡关键酶Caspase1活性升高,同时Caspase1、ASC、NLPR3、GSDMD基因和蛋白表达水平显著上调,这表明OGD/R后,细胞焦亡信号通路被激活。Caspase1是焦亡最主要的信号分子之一,Caspase1依赖性的促炎成分的释放和质膜破裂是焦亡的决定性特征,而VX-765是其特异性抑制剂^[7],本研究中,预先采用VX-765处理后,焦亡信号通路关键蛋白Caspase1及其下游信号分子蛋白GSDMD表达水平降低,培养上清液中细胞焦亡产物IL-1 β 、IL-18受到明显抑制,细胞活性也恢复至与对照组相近水平,进一步证明OGD/R引起的细胞活性降低是由于细胞焦亡所致。肺缺血-再灌注是体外循环中最突出的非生理刺激,肺泡上皮细胞结构和功能损坏是其最重要的病理生理特点,且发生于高炎症因子水平背景之下,这与细胞焦亡发生条件存在较高一致性。因此,本研究发现结果提示,体外循环中因肺缺血-再灌注引发的急性肺损伤中可能涉及肺泡上皮细胞焦亡机制的参与。

细胞焦亡常由细菌、病毒等病原微生物感染所诱发,是一种调节宿主细胞裂解性和炎症性的一种自身免疫性细胞死亡方式,通过释放炎症因子招募免疫细胞而达到清除感染原的目的^[8],但有研究显示,小鼠心肌缺血再灌注后触发NLRP3炎性体介导的焦亡^[9]、肾小管上皮细胞氧糖剥夺后焦亡相关蛋白的表达升高^[10]。本研究则表明,缺血-再灌注可引起肺泡上皮细胞发生焦亡,与先前的研究结果相一致。

细胞焦亡可通过两种途径发生,分别为依赖Caspase1的经典途径和依赖Caspase4、Caspase5和Caspase11的非经典途径^[11],本研究证实,OGD/R可通过Caspase1依赖的经典途径诱发肺泡上皮细胞焦亡,肺泡上皮细胞OGD/R是否会涉及非经典途径的焦亡尚有待进一步证实。经VX-765预处理后,细胞存活率和培养上清液中IL-1 β 恢复至与对照组相近水平,但IL-18仍处于较高水平,提示本研究条件下OGD/R对细胞的影响可能并不局限于细胞焦亡。

作为模拟CPB中肺泡上皮细胞缺血-再灌注的一种细胞模型,本研究结果对于拓展CPB相关肺损伤发生机制的认识有一定提示作用,但临床上CPB

相关肺损伤发生的机制涉及缺血-再灌注、全身炎症反应综合征、低温与复温、内毒素转位、手术创伤等复杂因素^[12],本研究在细胞外部环境、缺血-再灌注强度等方面并不能完整模拟体内肺泡上皮细胞的病理生理情况。因此,临床上CPB相关肺损伤是否涉及细胞焦亡及其参与程度如何,尚有待进一步证实。

总之,本研究发现,氧糖剥夺/恢复可诱导A549肺泡上皮细胞发生焦亡,抑制细胞焦亡的发生对缺血-再灌注细胞模型具有保护作用,这一机制可能参与体外循环相关性肺损伤的发生。

参考文献 (References)

- [1] MALTESEN R G, BUGGESKOV K B, ANDERSEN C B, et al. Lung protection strategies during cardiopulmonary bypass affect the composition of bronchoalveolar fluid and lung tissue in cardiac surgery patients [J]. *Metabolites*, 2018, 8(4): 54.
- [2] VAN O N, LAMKANFI M. Caspases in cell death, inflammation, and disease [J]. *Immunity*, 2019 50(6): 1352-64.
- [3] HOU L, YANG Z, WANG Z, et al. Nlrp3/asc-mediated alveolar macrophage pyroptosis enhances hmgb1 secretion in acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(8): 1052-64.
- [4] SUZUKI T, FUKUDA T, ITO T, et al. Continuous pulmonary perfusion during cardiopulmonary bypass prevents lung injury in infants [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 69(2): 602-6.
- [5] 吴丹, 黄志伟. 炎症体研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(WU D, HUANG Z W. Research advances in inflammasome [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2013, 35(10): 1426-33.
- [6] VANDE W L, LAMKANFI M. Pyroptosis [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(13): R568-72.
- [7] BOXER M, SHEN M, AULD D, et al. A small molecule inhibitor of caspase1 [J]. 2010, PMID: 21735610.
- [8] MAN S M, KARKI R, KANNEGANTI T D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 277(1): 61-75.
- [9] TOLDO S, MAURO A G, CUTTER Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-68.
- [10] DIAO C, CHEN Z, QIU T, et al. Inhibition of pmrt5 attenuates oxidative stress-induced pyroptosis via activation of the nrf2/ho-1 signal pathway in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2345658.
- [11] YUAN Y Y, XIE K X, WANG S L, et al. Inflammatory caspase-related pyroptosis: mechanism, regulation and therapeutic potential for inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2018, doi: 10.1093/gastro/goy011.
- [12] 唐茜茜, 彭艳华. 体外循环中七氟烷的肺保护效应机制研究进展[J]. *重庆医学*(TANG X X, PENG Y H. Progress of lung protective effect mechanism of sevoflurane in cardiopulmonary bypass [J]. *Chongqing Medicine*), 2018, 47(11): 1498-501.