

3-吲哚乙酸通过调控应激颗粒介导的NLRP3炎症小体激活减轻新生隐球菌诱导的脑微血管内皮细胞焦亡

陈晶宇, 邹金虎, 周炳亮, 高雪锋, 黄鹏伟, 曹虹

南方医科大学公共卫生学院微生物学系//广东省热带病研究重点实验室, 广东 广州 510515

摘要:目的 探究3-吲哚乙酸(IAA)通过调控应激颗粒(SGs)形成和炎症小体NLRP3激活来缓解新生隐球菌(Cn)诱导的脑微血管内皮细胞焦亡的作用机制。方法 采用 10^7 /mL浓度的Cn处理脑微血管内皮细胞构建体外细胞模型,并使用IAA进行干预。通过Western blotting、细胞免疫荧光、ELISA和CCK-8活性检测评估G3BP1、DDX3X、NLRP3及焦亡相关蛋白、细胞因子、细胞活性的变化。在免疫抑制的C57BL/6小鼠中,尾静脉注射Cn,连续7 d给予IAA灌胃治疗,构建体内动物实验模型。小鼠随机分为对照组、模型组及IAA处理组(3只/组)。通过依文思蓝实验检测血脑屏障通透性,取小鼠大脑皮层组织检测相关蛋白表达情况。结果 Cn感染可诱导脑微血管内皮细胞中G3BP1表达下调($P<0.05$)、DDX3X和NLRP3表达上调($P<0.05$)。IAA干预恢复了G3BP1、DDX3X和NLRP3的异常表达($P<0.05$),有效抑制焦亡相关蛋白NT-GSDMD/GSDMD($P<0.05$)和P20/Caspase1($P<0.01$)的活化,大幅减少炎症细胞因子IL-18($P<0.001$)、IL-1 β ($P<0.01$)的释放。IAA干预可逆转Cn引起的脑微血管内皮细胞DDX3X向NLRP3的转移($P<0.05$),促进DDX3X与G3BP1的结合($P<0.05$)。体内实验结果显示:IAA治疗可缓解血脑屏障的损伤,减少依文思蓝的渗出量(2.64 ± 0.32 vs 1.06 ± 0.12 , $P<0.001$),和大脑皮层中ZO-1的表达量($P<0.05$)。同时有效抑制VEGFR2、G3BP1、DDX3X、NLRP3和焦亡相关蛋白NT-GSDMD/GSDMD、P20/Caspase1的异常表达($P<0.05$)。结论 IAA通过调控SGs的形成以及炎症小体NLRP3的活化,有效缓解Cn引起的脑微血管内皮细胞焦亡。

关键词:新生隐球菌;焦亡;3-吲哚乙酸;应激颗粒;NLRP3炎症小体

Indole-3-acetic acid alleviates *Cryptococcus neoformans*-induced pyroptosis in cerebral microvascular endothelial cells by regulating stress granule-mediated NLRP3 inflammasome activation

CHEN Jingyu, ZOU Jinhu, ZHOU Bingliang, GAO Xuefeng, HUANG Pengwei, CAO Hong

Department of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Diseases Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate whether indole-3-acetic acid (IAA) alleviates *Cryptococcus neoformans* (Cn)-induced pyroptosis in cerebral microvascular endothelial cells by modulating stress granules (SGs) formation and the NLRP3 inflammasome. **Methods** *In vitro* cultured cerebral microvascular endothelial cells were pretreated with different concentrations of IAA before Cn infection (10^7 /mL), and the changes in cellular expressions of G3BP1, DDX3X, NLRP3 and pyroptosis-related proteins, cytokines, and cell viability were detected using Western blotting, immunofluorescence staining, ELISA, and CCK-8 assay. In the animal experiment, C57BL/6 mice with cyclophosphamide-induced immunosuppression were pretreated with saline or IAA gavage for 7 days before intravenous Cn injection. The changes in blood-brain barrier (BBB) integrity of the mice was assessed with Evans blue assay, and the brain cortical tissues were analyzed for changes in protein expressions. **Results** Cn infection significantly downregulated G3BP1 expression and upregulated the expressions of DDX3X and NLRP3 in cultured cerebral microvascular endothelial cells. IAA intervention not only restored normal expressions of G3BP1, DDX3X, and NLRP3, but also effectively suppressed the activation of pyroptosis-related proteins, including NT-GSDMD/GSDMD and P20/caspase-1, and reduced the release of IL-18 and IL-1 β . IAA treatment also inhibited the translocation of DDX3X to NLRP3 induced by Cn infection and promoted the binding between DDX3X and G3BP1. In Cn-infected C57BL/6 mice, IAA treatment significantly alleviated BBB injury, decreased the expression of ZO-1 in the cerebral cortex, and effectively ameliorated abnormal expressions of VEGFR2, G3BP1, DDX3X, NLRP3, NT-GSDMD/GSDMD and P20/caspase-1. **Conclusion** IAA effectively alleviates Cn infection-induced pyroptosis of cerebral microvascular endothelial cells by modulating the formation of SGs and activating the NLRP3 inflammasome.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; pyroptosis; indole-3-acetic acid; stress granules; NLRP3 inflammasome

新生隐球菌性脑膜炎(CM)是一种由新生隐球菌

(Cn)侵入中枢神经系统引发的机会性真菌感染,常见于艾滋病晚期患者,该病在全球艾滋病相关死亡中占15%~20%。在非洲,HIV相关隐球菌性脑膜炎的死亡人数占全球该病死亡人数的近2/3,且患者的10周死亡率高达50%^[1,2]。因此,研究CM的关键调控靶点具有重要价值。Cn的致病机制在于其能够破坏宿主体内血脑屏障(BBB)通透性平衡,从而实现对外中枢神经系统的入

收稿日期:2025-06-13

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82172259);广东省自然科学基金面上项目(2024A1515010606)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82172259).

作者简介:陈晶宇,硕士,E-mail: 2209661286@qq.com

通信作者:曹虹,博士,教授,博士生导师,E-mail: gzchao@smu.edu.cn

侵^[3,4]。脑微血管内皮细胞作为BBB主要的功能单元,在维持BBB完整性方面起核心作用^[5]。值得注意的是,脑微血管内皮细胞在病理状态下可能存在特定的死亡模式:研究证实,在缺血再灌注损伤过程中,脑微血管内皮细胞可以发生焦亡^[6,7]。本团队的前期研究发现,明确病原微生物可以引起脑微血管内皮细胞损伤^[8],也初步验证Cn可以诱导脑微血管内皮细胞焦亡^[9]。这为进一步阐明CM的发病机制并寻找潜在治疗靶点提供了重要理论依据。

Cn脑部感染可导致脑微血管内皮细胞损伤,并显著上调细胞内NLRP3炎性小体的表达水平^[10],进而驱动强烈的炎症反应——焦亡。维持细胞稳态的关键过程——应激颗粒(SGs)组装^[3],可能与Cn感染存在直接关联。研究表明,DEAD-boxRNA解旋酶3 X连锁(DDX3X)蛋白是调控细胞应激应答的核心分子,其可调节SGs的形成以及NLRP3炎性小体的组装^[11,12]。NLRP3炎性小体的形成需要DDX3X蛋白的参与,而SGs的形成会竞争性结合有限的DDX3X蛋白从而抑制NLRP3炎性小体的活化^[12]。基因层面也对这一竞争机制进一步证实:DDX3X基因敲除可抑制NLRP3炎性小体激活并减少细胞焦亡^[12]。综上,SGs组装和NLRP3炎性小体激活二者通过竞争共同的基本因子DDX3X而形成一种相互排斥、动态平衡的关系。这揭示了DDX3X在SGs和NLRP3炎性小体动态平衡中的核心地位,这种动态竞争机制赋予细胞根据DDX3X的可用性做出“适应应激(SGs形成)”以及“启动炎性死亡(焦亡)”的“生死抉择”^[13]。基于以上,我们推测在Cn感染中SGs的形成与否可能是细胞焦亡的重要原因,深入探究SGs调控机制,可能为治疗CM提供全新思路。

长期以来,3-吡啶乙酸(IAA)的研究焦点主要集中在植物领域。然而近年研究发现,色氨酸代谢产物在维持肠道稳态和全身免疫方面起着关键作用^[12],IAA作为色氨酸代谢产物,可以穿越BBB,具有显著的抗炎特性,并且可以调节炎症信号通路来抑制神经炎症^[14]。IAA还表现出清除自由基、抑制氧化应激和抗炎活性^[15]。此外,IAA能够有效抑制NF- κ B信号通路的激活和NLRP3的形成,从而减少促炎细胞因子的释放,减轻炎症反应^[16]。

然而,目前尚不清楚IAA是否能够缓解Cn感染引起的脑微血管内皮细胞焦亡,其潜在机制也有待阐明。同时,SGs是否在这一病理过程中发挥调节作用仍是一个值得探索的科学问题。鉴于此,本研究拟通过体内外结合的实验设计,系统考察IAA对Cn感染引起的脑微血管内皮细胞焦亡的防护作用,并深入探究其潜在作用机制。这一研究将为开发针对Cn感染相关脑损伤的新治疗策略提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 脑微血管内皮细胞的培养 人脑微血管内皮细胞系(HCMEC, iCell-h070, Cellverse公司)37℃水浴锅中进行复融后,迅速置于15 mL离心管中。随后加入10 mL含有10%胎牛血清的完全培养基,充分混匀后在1000 r/min转速下离心5 min。移去上清液后,用15 mL含10%胎牛血清的完全培养基重新悬浮细胞沉淀,接种于75 cm²细胞培养瓶中,并将其转移至37℃、5% CO₂的细胞培养箱中进行培养。待细胞增殖至密度约为80%时,进行传代培养。实验中选用1~5代的细胞进行铺板,确保细胞处于良好的生长状态。

1.1.2 动物实验 C57BL/6J雌性小鼠,6~8周龄,C57BL/6J野生型小鼠购买于南方医科大学实验动物中心。所有动物实验均经南方医科大学实验动物中心伦理委员会审核批准(伦理批号:D2022089)。

1.1.3 真菌培养 Cn(B-4500F02),由美国南加州大学洛杉矶儿童医院黄胜和教授惠赠。用沙氏葡萄糖培养基培养于34℃摇床180 r/min。冻存于含10%甘油的沙氏葡萄糖培养基中,温度为-80℃。

1.2 主要试剂及仪器

沙氏葡萄糖液体、固体培养基(环凯微生物)、DMEM培养基(Biosharp)、L15培养基、0.25%胰蛋白酶(Gibco)、胎牛血清(Pricella)、3-吡啶乙酸、CCK-8试剂盒(Glpbio)、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、 β -actin单克隆抗体(Solarbio)、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂(Apexbio)、紧密连接蛋白(ZO-1)单克隆抗体、血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)单克隆抗体、DDX3X单克隆抗体(Immunoway)、G3BP1多克隆抗体(Proteintech)、NLRP3多克隆抗体、ELISA试剂盒IL-18和IL-1 β 、GSDMD(N terminal)多克隆抗体(Huabio)、cleaved caspase 1多克隆抗体(Zen bioscience)、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(Proteintech)、山羊抗兔荧光二抗、山羊抗鼠荧光二抗(ABclonal)、环磷酰胺,一水、三溴乙醇、三氯乙酸(Aladin)、依文思蓝(Leagene)。

恒温培养箱(Thermo Fisher)、酶标仪(Tecan)、化学发光凝胶成像系统(UVP)、荧光显微镜(Nikon)、SDS-PAGE凝胶电泳仪(Bio-rad)、NanoDrop微量分光光度计(Denovix)。

1.3 方法

1.3.1 细胞给药 将脑微血管内皮细胞接种于细胞培养板中,置于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中培养12 h以上,待细胞贴壁并状态稳定后,更换新鲜L15培养基。将市售IAA溶于二甲基亚砜(DMSO)中,无菌状态下配制成梯度递增浓度(分别为0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.2 mmol/L),并确保DMSO终浓度低于千分之一。将

IAA 预处理细胞 2 h。随后,将 Cn 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次,重悬于 L15 培养基中,通过细胞计数板在显微镜下计数并稀释至浓度为 10^9 /mL,1 mL 培养基加入 10 μ L Cn 溶液,即最终处理浓度调整为 10^7 /mL,并在细菌培养箱中继续培养 3 h^[17],以备后续实验。

1.3.2 动物分组及处理 选用 6~8 周龄雌性健康 C57BL/6J 小鼠作为研究对象,随机均分为 3 组:空白对照组 (Control)、模型组 (Cn 处理组)、IAA 治疗组 (IAA+Cn 处理组),每轮实验每组至少保留 3 只小鼠。所有小鼠均在尾静脉注射 Cn 72h 前进行免疫抑制 (200 mg/kg 环磷酰胺,一水合物,溶于生理盐水,腹腔注射)。IAA 治疗组小鼠每日给予 200 μ L 20 mg/kg^[18] 剂量的 IAA 灌胃治疗,持续 5 d 后进行 10^7 /mL 浓度的 Cn 菌液尾静脉注射,随后继续进行 2 d 的 IAA 灌胃处理^[18]。作为对照,WT 组小鼠和 Cn 组小鼠均以生理盐水进行灌胃,整个实验周期为 7 d。实验结束后,所有小鼠均采用颈脱位法处死,随后取材取大脑皮层样本,以备后续实验分析^[19,20]。

1.3.3 CCK-8 细胞增殖与毒性实验 细胞活力的体外检测采用 CCK-8 进行定量评估。实验步骤:首先,将人脑微血管内皮细胞接种于 96 孔培养板 (排除边缘孔的影响)。经过相应处理后,弃去原有培养基,加入含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基。将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 1~4 h。待孵育完成后,使用酶标仪检测吸光度值 $A_{450\text{nm}}$ 。当读数稳定且约等于 1 时,记录最终测定结果,作为细胞活力的评估指标。

1.3.4 提取细胞全蛋白 使用 PBS 对细胞进行 3 次轻柔清洗 (每次 500 μ L/孔)。向 6 孔板加入 300 μ L/孔预冷的裂解液混合物 (由 RIPA 裂解液与 100 \times 的蛋白酶抑制剂以及 100 \times 的蛋白磷酸酶抑制剂按 100:1:1 的体积比混合,现用现配)。将混合液置于预冷的冰上静置 20 min。采用细胞刮刀对细胞进行破碎,确保充分裂解。收集裂解后的细胞全蛋白,使用低温离心机在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 12 000 g 离心 10 min,以去除不溶物,收集上清液作为总蛋白样品。采用超微量分光光度计 $A_{280\text{nm}}$ 测蛋白浓度。随后,按照标准操作程序加入 SDS-PAGE 样品缓冲液,并将样品在 98 $^{\circ}$ C 金属浴中处理 8 min 以使蛋白质充分变性,最后将样品转移至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存备用。

1.3.5 提取动物组织全蛋白 按照实验操作规程,称取各组小鼠大脑皮层组织质量 (20~30 mg),依据组织质量与裂解液体积比为 100:1 (20 mg 组织对应 200 μ L 裂解液) 精确配制裂解液,并根据实际组织质量调整裂解液体积。将匀浆后的样本置于冰盒中静置 20 min,以确保组织充分裂解。随后,将样本在 4 $^{\circ}$ C 条件下以 12 000 g 离心 15 min,取上清液备用。采用超微量分光光度测定吸光度 $A_{280\text{nm}}$ 。取适量上清液加入适量的上样缓冲液,经 98 $^{\circ}$ C 金属浴处理 8 min,并立即转入 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰

箱长期保存备用。

1.3.6 细胞免疫荧光 对细胞进行固定处理。对于细胞膜蛋白的检测,使用 4% 多聚甲醛在室温条件下固定 30 min;而对于细胞内蛋白的检测,则需要将细胞置于预冷至 -20 $^{\circ}$ C 的甲醇中,在 -20 $^{\circ}$ C 条件下固定 30 min。固定完成后,依次用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 对细胞进行洗涤。洗涤之后,采用含 2% BSA 和 22.52 mg/mL 甘氨酸的 PBST 溶液对细胞进行封闭处理,封闭时间为 1 h。在 4 $^{\circ}$ C 条件下进行一抗孵育。本实验使用的一抗包括针对细胞膜蛋白的 GSDMD (N terminal) 抗体,细胞质蛋白的 NLRP3、Cleaved-Caspase1、G3BP1 和 DDX3X 抗体,其中 G3BP1 一抗稀释比例为 1:1000,其余一抗稀释比均为 1:200,过夜孵育。随后,再次用 PBST 缓冲液对细胞进行 3 次洗涤,之后进行荧光二抗孵育。二抗的稀释比例为 1:200,孵育时间为 1 h。孵育完成后,再次用 PBST 缓冲液洗涤 3 次,并在黑暗条件下加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色,染色时间为 8 min。在荧光显微镜下对染色后的细胞进行观察。

1.3.7 Western blotting 检测相关蛋白表达水平 将 PVDF 膜在含 3% BSA 的含 Tween-20 的 Tris 缓冲盐水 (TBST) 溶液中预封闭 2 h (室温条件下)。随后,将膜与一抗 [包括 ZO-1、VEGFR2、G3BP1、DDX3X、NLRP3、cleaved caspase1、GSDMD (N terminal) 及 β -actin] (均为 1:2000 稀释比例) 在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜孵育,或置于室温摇床中孵育 1.5 h。孵育完成后,将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗 (山羊抗兔或山羊抗鼠,稀释比例为 1:5000) 在室温条件下反应 1 h。采用 TBST 对膜进行洗涤 (洗涤次数为 3 次,10 min/次)。最后,滴加 ECL 显影液,通过化学发光成像系统进行检测,并以 β -actin 的表达水平作为内参进行标准化,以确保实验结果的可靠性。

1.3.8 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清炎症细胞因子 IL-18、IL-1 β 的表达 取细胞培养液,于 4 $^{\circ}$ C、6000 r/min 离心 3 min,移液枪吸取上清置于新的 EP 管中 -80 $^{\circ}$ C 保存。将酶标板以及配套试剂提前去除置于室温平衡 20 min。将分析试剂 50 μ L 加入对应孔。加入不同浓度的标准品以及样品 50 μ L,室温 18~25 $^{\circ}$ C 反应 15 min,加入 50 μ L/孔检测试剂,封板膜密封室温摇床孵育 1 h。洗涤液洗涤 4 次,加入辣根过氧化物酶标记的抗体,封板膜密封室温摇床孵育 30 min。洗涤液洗涤 4 次,加入 TMB 显色液,反应 20 min,加入终止液,酶标仪测量吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。经标准曲线计算各样品浓度。

1.3.9 Cn 生长曲线测量 Cn PBS 清洗 3 次,细胞计数板计数,沙氏葡萄糖培养基稀释至 10^3 /mL,接种于 96 孔板中,加入药物,每 12 h 测量吸光度 $A_{405\text{nm}}$ ^[21],共测量 120 h。

1.3.10 依文思蓝实验检验 BBB 完整性 小鼠尾静脉注射 2% 依文思蓝溶液 0.1 mL/10 g, 2 h 后, 根据小鼠体重使用 2.5% 三溴乙醇 200~300 μ L 麻醉, 生理盐水心尖灌注, 取脑。以空白对照组为基准, 50% 三氯乙酸溶液 0.5 mL 60 Hz 匀浆 1 min。取匀浆与无水乙醇 1:3 混匀后, 2000 g 4 $^{\circ}$ C 低温离心 10 min。取上清 100 μ L 于 96 孔板测吸光度 $A_{620\text{ nm}}$, 带入标准曲线后得浓度。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件统计分析数据, 采用 GraphPad Prism 9.5.0 制作统计图表。3 个及以上的独立组比较采用单因素方差分析, 两个独立组比较采用独立样本 *t* 检验, 所有实验至少有 3 次重复, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞免疫荧光分析 Cn 感染后脑微血管内皮细胞中 G3BP1、NLRP3 和 DDX3X 蛋白表达水平变化

细胞免疫荧光结果显示, Cn 处理后, 细胞 G3BP1 表达下降 ($P < 0.05$, 图 1A、B), 细胞 DDX3X 表达上升 ($P < 0.01$, 图 1C、D), 细胞 NLRP3 表达上升 ($P < 0.01$, 图 1E、F)。

2.2 Western blotting 检测 Cn 处理脑微血管内皮细胞后细胞 G3BP1、DDX3X 和 NLRP3 的表达情况

Western blotting 结果显示, Cn 处理后, 细胞 G3BP1 表达下降 ($P < 0.05$, 图 2A), 细胞 DDX3X 表达上升 ($P < 0.05$, 图 2B), 细胞 NLRP3 表达上升 ($P < 0.001$, 图 2C)。

2.3 IAA 可缓解 Cn 引起的脑微血管内皮细胞焦亡

梯度浓度 IAA (0.01~0.2 mmol/L) 均可缓解 Cn 引起的脑微血管内皮细胞损伤 ($P < 0.001$), 其中 0.025 mmol/L 效果为最佳 (图 3A)。Cn 的生长曲线, IAA 处理不会引起 Cn 活性变化 (图 3B)。Western blotting 检测显示, IAA 可以缓解 Cn 引起的脑微血管内皮细胞中 G3BP1、DDX3X、NLRP3、NT-GSDMD/GSDMD、P20/Caspase1 的变化 ($P < 0.05$, 图 3C~G)。ELISA 结果显示, IAA 可以缓解 Cn 引起的脑微血管内皮细胞释放炎症细胞因子 IL-18、IL-1 β 增加 ($P < 0.01$, 图 3I~J)。

2.4 细胞免疫荧光检测 IAA 可逆转 G3BP1、DDX3X 和 NLRP3 的变化

IAA 处理脑微血管内皮细胞 G3BP1 的表达不会变化 ($P > 0.05$), IAA 治疗后, 可缓解 Cn 引起的细胞 G3BP1 表达下降 ($P < 0.05$, 图 4A、D); IAA 处理脑微血管内皮细胞 DDX3X 的表达不会变化 ($P > 0.05$), IAA 治疗后可缓解 Cn 引起的细胞 DDX3X 表达上升 ($P < 0.05$, 图 4B、E); IAA 处理脑微血管内皮细胞 NLRP3 的表达不会变化 ($P > 0.05$), IAA 治疗后可缓解 Cn 引起的细胞 NLRP3 表达上升 ($P < 0.05$, 图 4C、F)。

2.5 IAA 调控 DDX3X 对 Cn 诱导的脑微血管内皮细胞中 SGs 生成和 NLRP3 炎性小体活化

免疫荧光双染色结果显示, G3BP1 和 DDX3X 之间的相互作用在空白对照组及 IAA 对照组中表现更为紧密, 两组中 G3BP1 和 DDX3X 的皮尔森相关系数较高。经 Cn 处理后, 二者之间的皮尔森相关系数下降 ($P < 0.01$)。在 IAA 治疗干预后, G3BP1 和 DDX3X 的相互作用较 Cn 处理组增强 ($P < 0.05$), 且恢复至与对照组相当的水平 ($P > 0.05$, 图 5A、B)。

在 NLRP3 和 DDX3X 相互作用研究中, 观察到了截然不同的变化趋势。在空白对照组及 IAA 对照组中, 二者之间的皮尔森相关系数较低。然而, 在 Cn 处理后, NLRP3 和 DDX3X 的相互作用显著增强, 皮尔森相关系数显著升高 ($P < 0.01$)。随后的 IAA 治疗导致二者的相互作用又显著减弱 ($P < 0.05$), 其皮尔森相关系数恢复至与对照组相当的水平 ($P > 0.05$, 图 5C、D)。

2.6 体内实验验证 IAA 调控 SGs 的形成对 Cn 诱导的 BBB 焦亡的作用

依文思蓝染色实验结果显示, C57 小鼠经 IAA 灌胃治疗后, 其 BBB 通透性改善 ($P < 0.001$, 图 6A)。Western blotting 实验结果显示, 较 Cn 感染组, C57 小鼠经 IAA 灌胃治疗后, ZO-1 表达上升 ($P < 0.05$, 图 6B)。IAA 缓解了 Cn 感染导致的小鼠大脑皮层 VEGFR2 表达水平的下降 ($P < 0.01$, 图 6C)。Cn 感染后小鼠大脑皮层 G3BP1 表达的降低可通过 IAA 治疗逆转 ($P < 0.05$, 图 6D); IAA 可抑制 Cn 引起的 DDX3X ($P < 0.01$) 和 NLRP3 ($P < 0.05$) 表达的异常升高 (图 6E、F)。IAA 能有效抑制焦亡相关蛋白 NT-GSDMD/GSDMD 和 P20/Caspase1 表达的上调 ($P < 0.01$, 图 6G、H)。

3 讨论

CM 是艾滋病患者中最常见的传播真菌病占实体器官移植受者侵袭性真菌病的 7%~8%^[22]。本研究针对 Cn 导致中枢神经系统感染这一临床难题, 探讨了其作用机制及潜在的治疗策略。目前, Cn 穿过 BBB 并引发 CM 的具体机制尚不明确。前期研究发现 Cn 可诱导脑微血管内皮细胞衰老并引发神经炎症^[23], 同时证实可引发 BBB 焦亡^[9]。色氨酸代谢产物在神经炎症调节中具有重要作用。研究表明, 犬尿喹啉酸作为色氨酸代谢物虽然可以缓解神经炎症^[24], 但其无法有效通过 BBB 的缺陷限制了其临床应用价值。相比之下, IAA 作为色氨酸代谢吡啶途径的关键产物, 具有良好的 BBB 通透性, 并展现出显著的抗炎特性。基于此, 本文着手探究 IAA 在 CM 治疗中的应用潜力及其作用机制。

宿主细胞应激颗粒 (SGs) 组装是其对抗微生物感染的广泛反应, 同时 SGs 组装也是细胞防御微生物感染的重要武器^[25, 26]。已有研究表明, SGs 的形成与细胞焦亡存在密切联系, 尤其是在缺血再灌注损伤模型中, 促

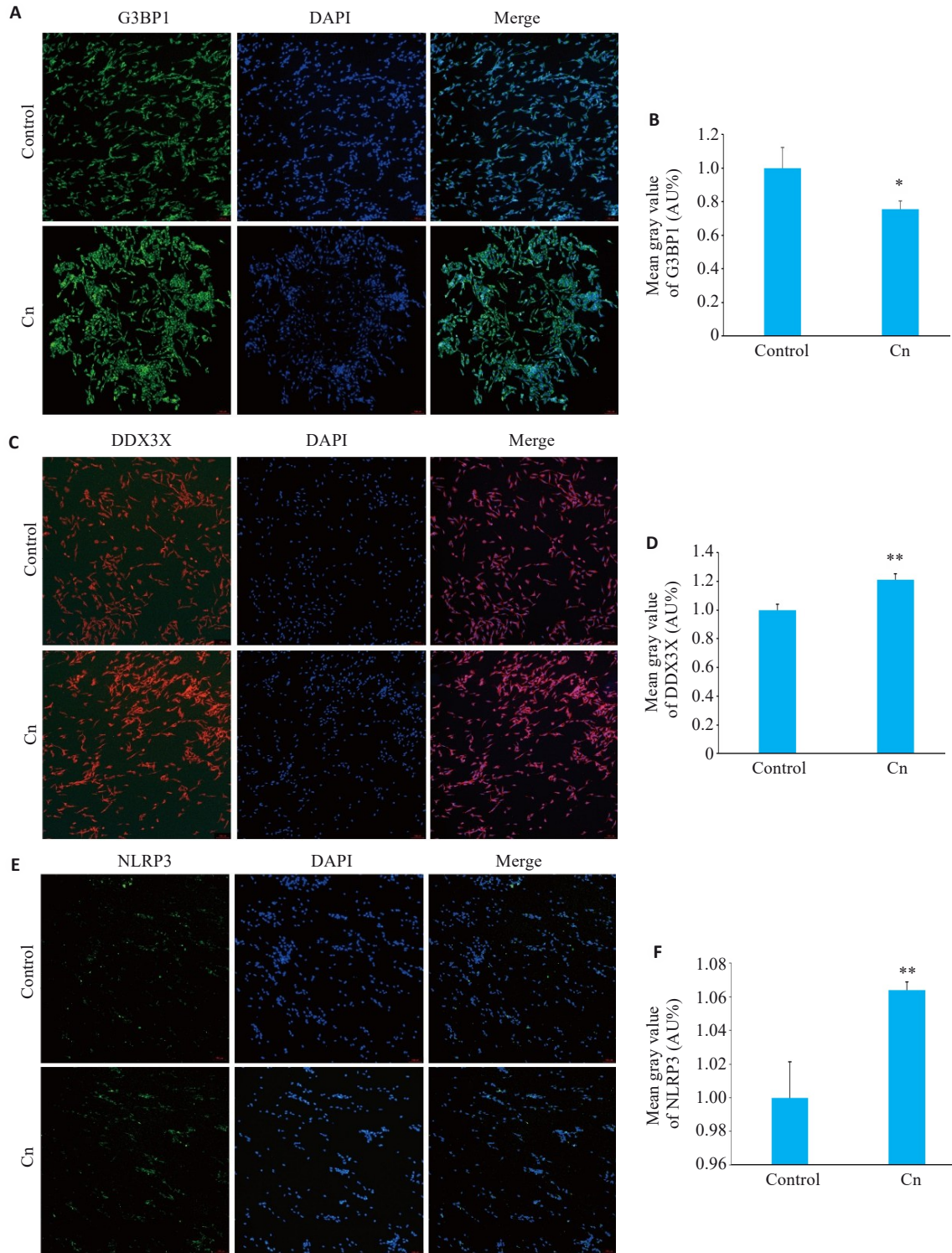


图1 细胞免疫荧光分析Cn感染后脑微血管内皮细胞中G3BP1、DDX3X和NLRP3蛋白表达水平变化
 Fig.1 Immunofluorescence staining for G3BP1 (A, B), DDX3X (C, D) and NLRP3 (E, F) in cerebral microvascular endothelial cells with Cn infection (Original magnification: $\times 100$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

进SGs的形成能够显著抑制NLRP3炎症小体的形成,从而有效遏制细胞焦亡的发生^[15,27]。G3BP1作为SGs的重要组分,其表达水平能够有效反映SGs的组装状态^[28]。本研究选择G3BP1作为观察SGs形成情况的标志性指标。然而,上述SGs形成与焦亡的相互作用在Cn的感染情境下是否成立,尚属未知。鉴于Cn感染可以引起脑微血管内皮细胞焦亡,以及鉴于细胞应激反应

的保守性,我们推测Cn感染中也存在类似的“SGs-焦亡调控轴”。为验证此假设,本研究首先检测Cn处理对脑微血管内皮细胞SGs形成的影响。通过Western blotting实验以及细胞免疫荧光实验发现,Cn的处理显著降低G3BP1的表达水平及SGs的形成,以及上调NLRP3的表达。表明Cn感染有效抑制了宿主SGs的组装,这一发现与缺血再灌注损伤模型中观察到的SGs

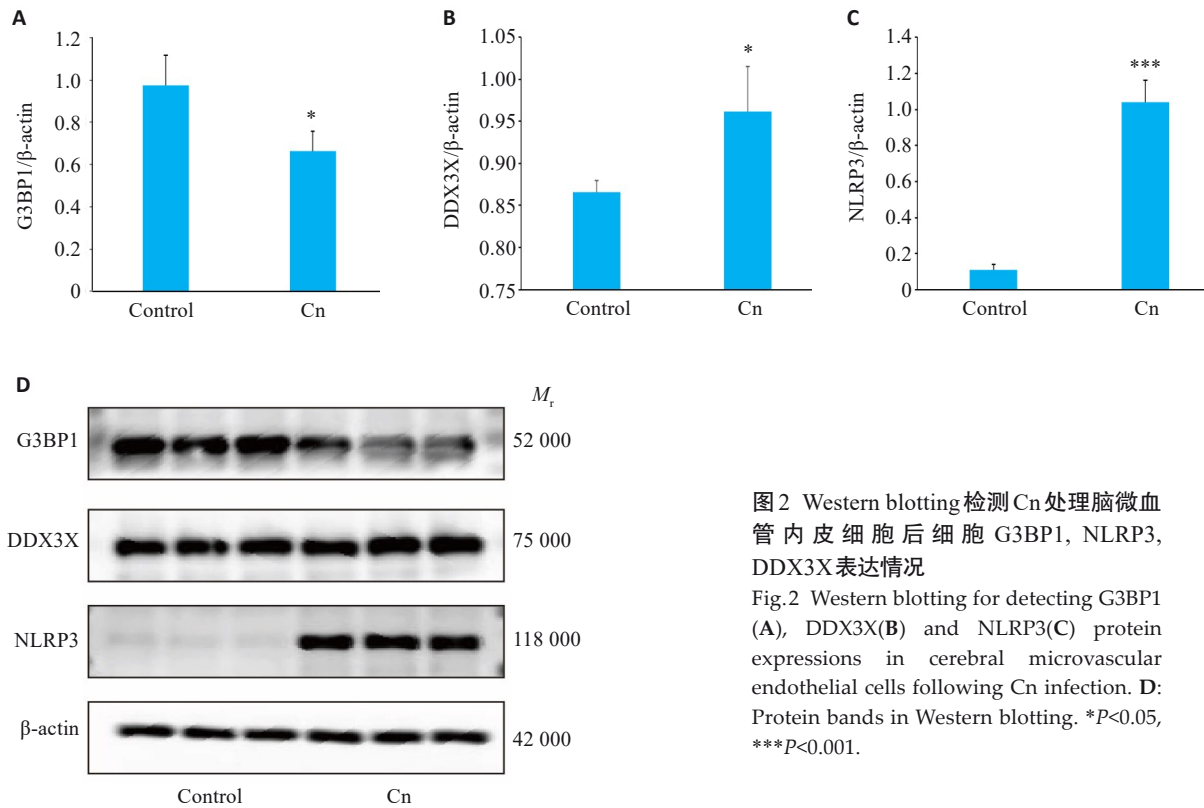


图2 Western blotting检测Cn处理脑微血管内皮细胞后细胞G3BP1, NLRP3, DDX3X表达情况
 Fig.2 Western blotting for detecting G3BP1 (A), DDX3X(B) and NLRP3(C) protein expressions in cerebral microvascular endothelial cells following Cn infection. D: Protein bands in Western blotting. *P<0.05, ***P<0.001.

形成抑制伴随脑微血管内皮细胞焦亡发生^[12]的现象在逻辑上一致。为进一步探究基于Cn感染下的SGs调节机制的治疗策略提供了理论及实验依据。

本研究旨在系统评估IAA对CM的治疗效果及其作用机制,为此建立了体内外双重实验模型。体外实验采用脑微血管内皮细胞模型探究IAA的作用效应,而体内则通过C57小鼠构建了CM动物模型。细胞实验结果显示,通过不同梯度浓度的IAA处理,发现IAA具有显著的细胞保护作用,最终选择具有最佳治疗效果的浓度用于后续研究。Cn生长曲线实验显示,与未处理组相比,IAA处理组的Cn生长情况无显著差异,这表明IAA在发挥保护作用的同时,并未影响真菌的活性,从而排除了IAA通过抑制真菌生长而间接减少细胞损伤的可能性。后续引入IAA对照组以及IAA治疗组,结果表明,一定浓度的IAA处理细胞后,不会对细胞产生毒性作用,并且可以缓解Cn引起的脑微血管内皮细胞焦亡,同时对Cn引起的G3BP1、DDX3X和NLRP3相关变化具有显著的调控作用。研究表明,特定浓度的IAA通过促进细胞SGs的形成,有效抑制NLRP3炎症小体的组装,显著缓解了Cn诱导的脑微血管内皮细胞焦亡。这一系列作用最终导致疾病进程的显著改善,为治疗CM提供了新的潜在治疗策略,具有重要的临床应用价值。

为深入解析DDX3X在Cn感染条件下调控SGs形成及NLRP3表达的分子机制,我们通过免疫荧光技术对DDX3X与G3BP1、NLRP3的共定位情况进行了系统性研究。实验结果表明,在Cn感染的刺激下,

DDX3X与NLRP3之间形成显著的共定位,且这种相互作用的增强明显抑制了DDX3X与G3BP1的结合。当引入IAA进行干预后,本研究观察到DDX3X表现出向G3BP1重新分布的趋势,同时其与NLRP3的相互作用被显著抑制,提示IAA可能通过促进SGs的形成,有效抑制NLRP3炎症小体的活化,最终达到缓解Cn感染诱发的细胞焦亡的效果。这表明SGs、DDX3X和NLRP3炎症小体之间可能存在一个动态调控网络,在CM的病理进程中发挥着关键作用。这一调控网络的阐明,为深入理解Cn感染引发的宿主细胞死亡以及IAA的治疗机制提供了新的视角。

为进一步验证实验结果,我们进行了体内动物实验研究。选用C57小鼠构建CM模型,并给予IAA灌胃治疗。通过依文思蓝实验评估小鼠BBB通透性,结果显示:与Cn处理组相比,IAA治疗组小鼠的BBB完整性显著提高,但仍略低于空白对照组水平,表明IAA在动物实验层面能够有效改善Cn引起的BBB通透性改变。ZO-1广泛在各种内皮细胞中表达,并在其周围表现为一条连续的条带,同时,ZO-1作为BBB的结构成分,脑微血管内皮细胞的ZO-1表达在维持BBB的完整性方面起着重要作用^[29,30]。已有研究指出,细胞发生焦亡会引起细胞ZO-1表达下降^[31]。本研究显示,Cn处理的小鼠大脑皮层ZO-1表达显著下降,提示BBB通透性增强,经IAA治疗后,ZO-1表达升高,提示IAA对于保护BBB的完整性有重要意义。VEGFR2在血管生成过程中发挥重要作用,VEGFR2表达升高能够促进血管内皮

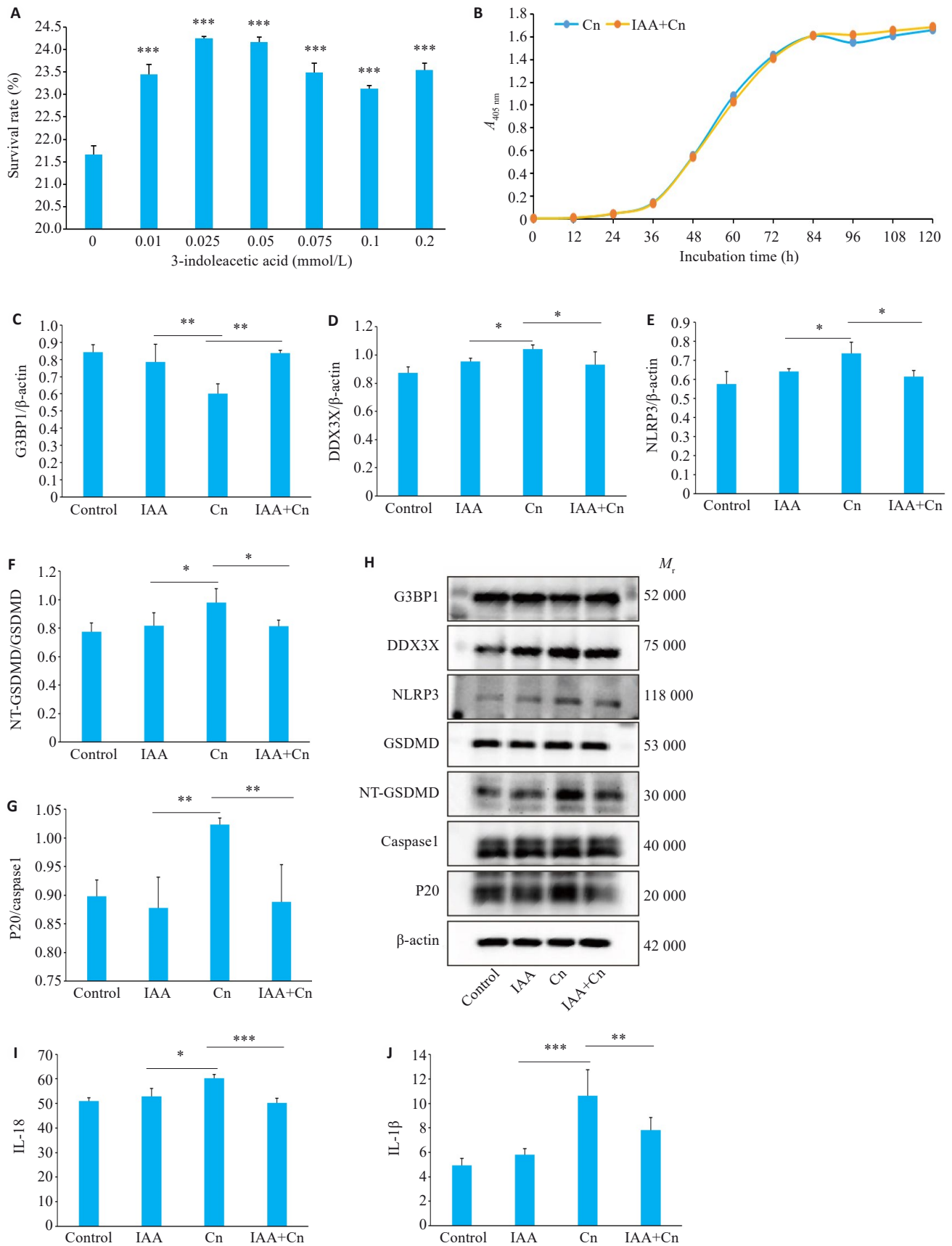


图3 IAA可缓解Cn引起的脑微血管内皮细胞焦亡

Fig.3 IAA alleviates Cn-induced pyroptosis of cerebral microvascular endothelial cells. **A**: Survival rates of Cn-infected cerebral microvascular endothelial cells treated with gradient concentrations of IAA. *** $P < 0.001$ vs 0 mmol/L. **B**: The growth curve of Cn after IAA treatment. **C-G**: Expressions of G3BP1, DDX3X, NLRP3, NT-GSDMD/GSDMD, and P20/caspase-1 in Cn-infected cerebral microvascular endothelial cells with IAA treatment. **H**: Protein bands by Western blotting. **I-J**: IL-18 and IL-1β levels in the cell culture supernatant determined by ELISA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

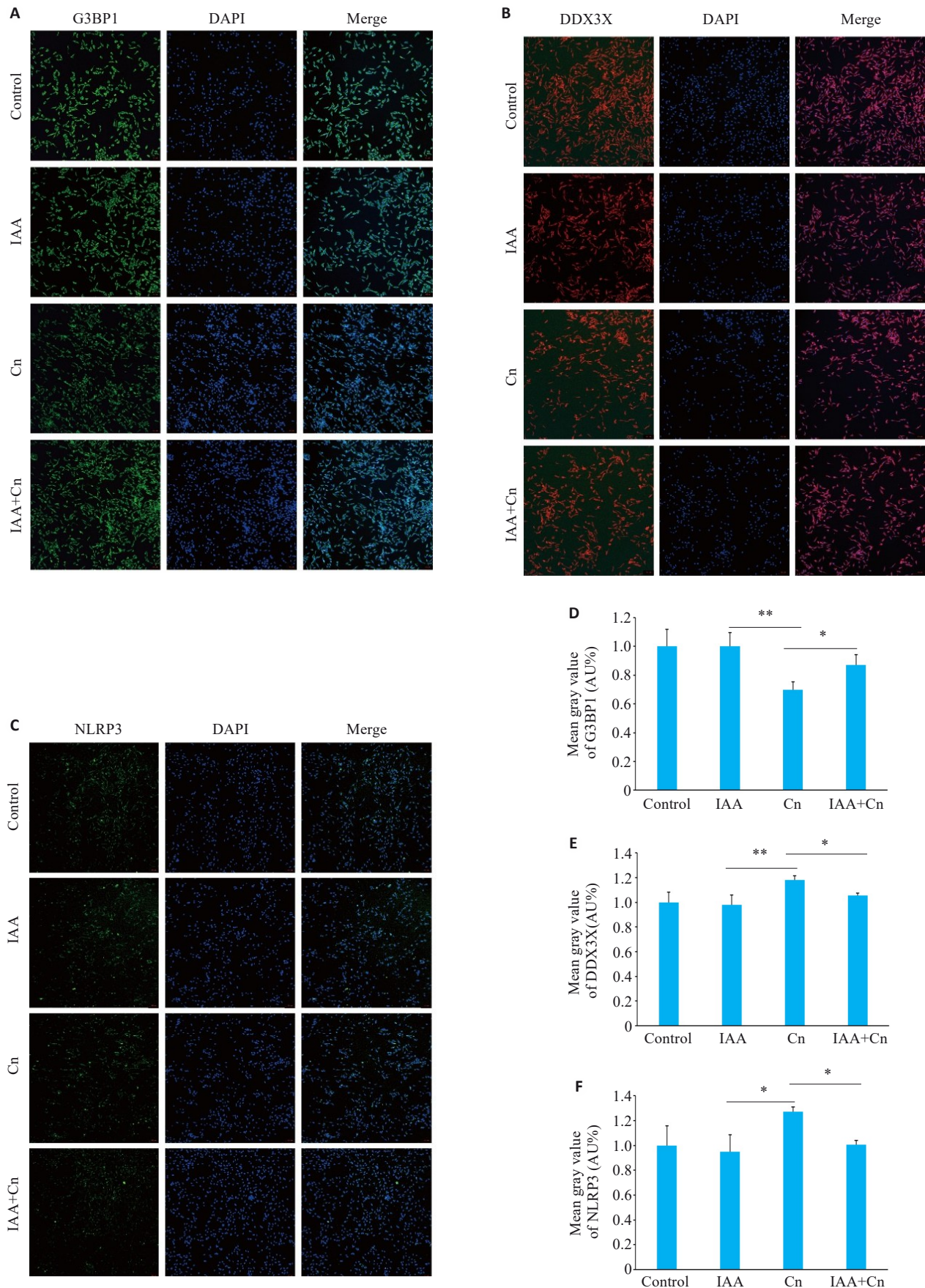


图4 细胞免疫荧光检测IAA可减轻Cn引起的G3BP1、DDX3X和NLRP3的变化

Fig.4 IAA alleviates Cn-induced changes in G3BP1, DDX3X and NLRP3 expressions in cerebral microvascular endothelial cells (Immunofluorescence staining, $\times 100$). **A, D**: Effect of IAA on G3BP1 expression in Cn-infected cerebral microvascular endothelial cells. **B, E**: Effect of IAA on DDX3X expression in Cn-infected cerebral microvascular endothelial cells. **C, F**: Effect of IAA on NLRP3 expression in Cn-infected cerebral microvascular endothelial cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

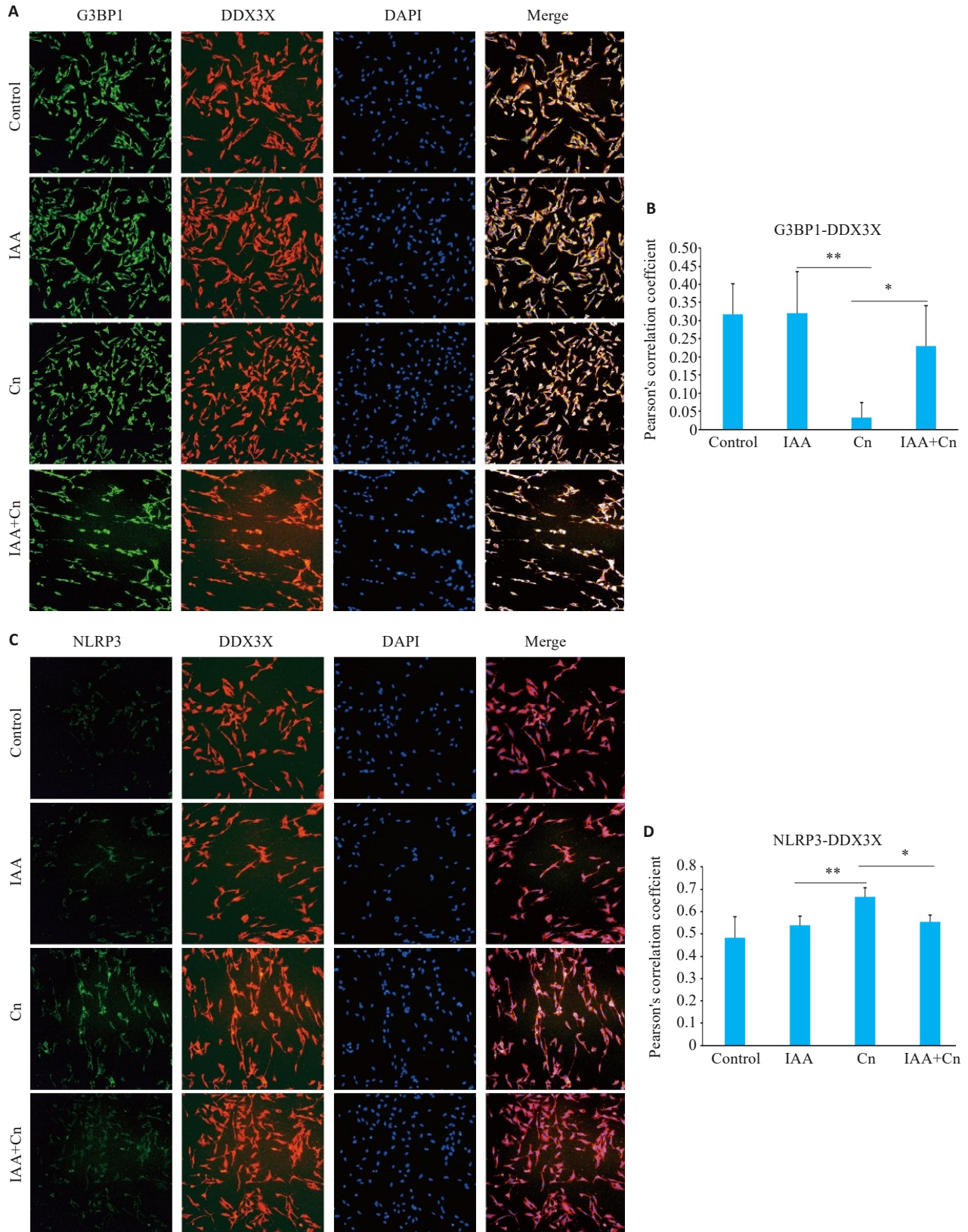


图5 IAA调控DDX3X对Cn诱导的脑微血管内皮细胞中SGs生成和NLRP3炎性小体活化

Fig.5 IAA regulates translocation of DDX3X in the formation of SGs and activation of NLRP3 inflammasome in Cn-infected cerebral microvascular endothelial cells (Immunofluorescence staining, ×200). A, B: Co-localization of G3BP1 and DDX3X in cells treated with Cn and IAA. C, D: Co-localization of NLRP3 and DDX3X in cells treated with Cn and IAA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

细胞修复、血管生成及内皮伤口愈合^[32]。在缺血再灌注损伤相关研究中发现,脑微血管内皮细胞 VEGFR2 表达会因缺血再灌注损伤而下降,但随着缺血组织的血管

新生和血液供应改善,VEGFR2 表达则会上升,同时内皮细胞焦亡情况得以缓解^[33]。本实验发现,Cn 处理的小鼠大脑皮层 VEGFR2 表达水平显著降低,而经 IAA

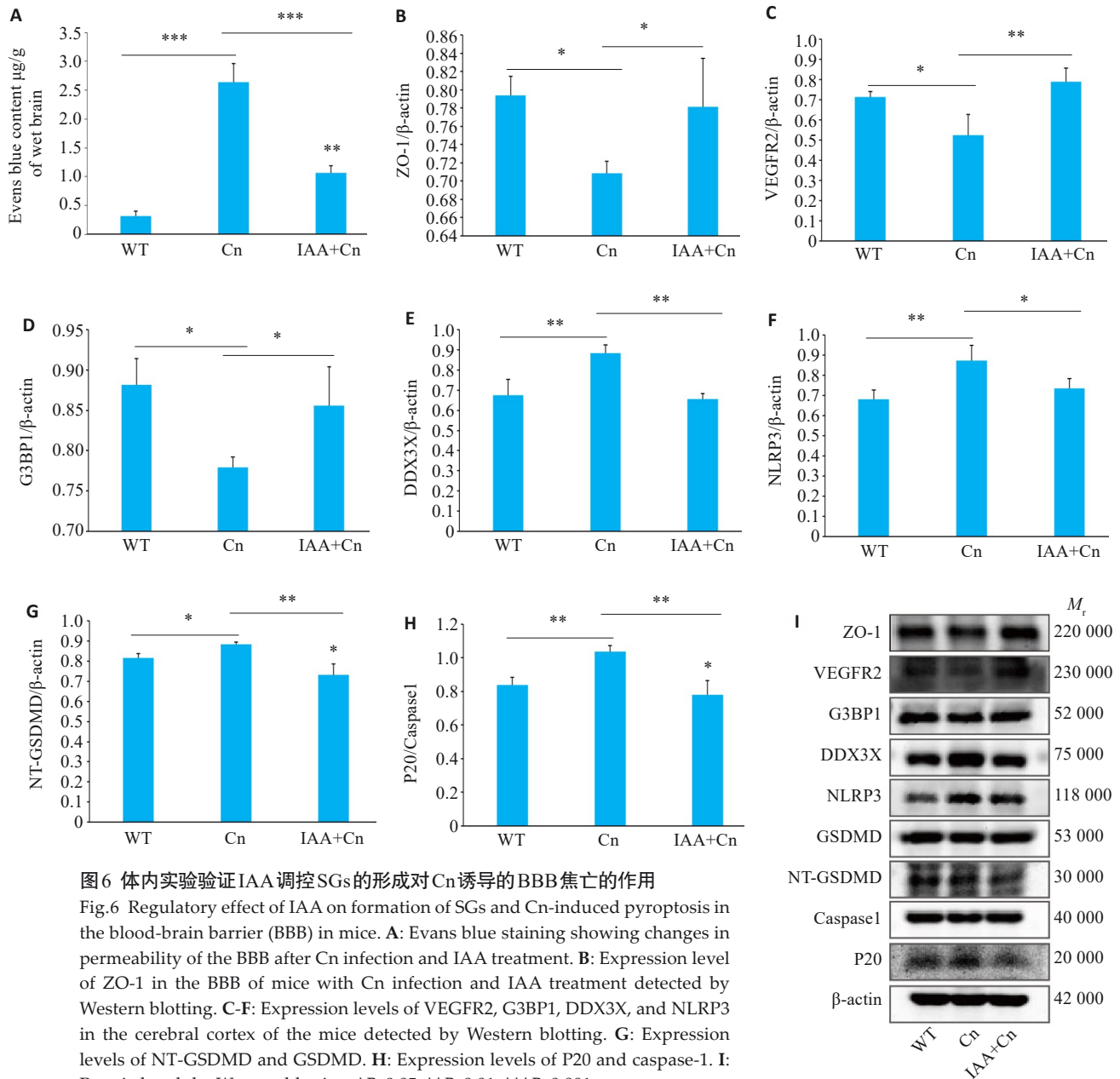


图6 体内实验验证IAA调控SGs的形成对Cn诱导的BBB焦亡的作用

Fig.6 Regulatory effect of IAA on formation of SGs and Cn-induced pyroptosis in the blood-brain barrier (BBB) in mice. **A:** Evans blue staining showing changes in permeability of the BBB after Cn infection and IAA treatment. **B:** Expression level of ZO-1 in the BBB of mice with Cn infection and IAA treatment detected by Western blotting. **C-F:** Expression levels of VEGFR2, G3BP1, DDX3X, and NLRP3 in the cerebral cortex of the mice detected by Western blotting. **G:** Expression levels of NT-GSDMD and GSDMD. **H:** Expression levels of P20 and caspase-1. **I:** Portein bands by Western blotting. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

治疗后, VEGFR2表达水平明显回升。这一结果从血管内皮损伤修复的角度进一步证实了IAA的治疗作用。此外, 实验结果表明: IAA治疗组小鼠大脑皮层中G3BP1表达显著上调, 而DDX3X和NLRP3的表达水平则显著降低, 同时细胞焦亡水平显著下降。这些体内实验结果与体外细胞实验结果高度一致, 进一步证明了IAA通过调控SGs的形成来改善细胞焦亡的治疗效果。

综上, 本研究发现IAA通过促进SGs的形成并抑制NLRP3炎性小体的活化, 进而显著降低Cn感染引起的脑微血管内皮细胞焦亡水平。这一发现不仅揭示了IAA在治疗CM中的潜在价值, 还为基于SGs、DDX3X和NLRP3炎性小体动态调控机制的新型治疗策略开发提供了重要的理论依据。研究还表明, 通过调节SGs、DDX3X和NLRP3炎性小体的动态平衡, 可能为治疗CM开辟新的治疗思路。然而, 本研究仍存在一定的局

限性: 尽管现有数据支持IAA作为潜在治疗药物的可能性, 但对IAA改善脑微血管内皮细胞焦亡的分子机制研究仍处于初步探索阶段, 其临床应用价值尚需进一步验证。未来研究可着重探讨IAA调控DDX3X在SGs与NLRP3炎性小体形成过程中转移和平衡的分子机制, 以为IAA在CM治疗中的应用和预后评估提供更有力的证据支持。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Tugume L, Ssebambulidde K, Kasibante J, et al. Cryptococcal meningitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9: 62.
 [2] Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(12): 1748-55.

- [3] Liu LJ, Tang YF, Zhang L, et al. The molecular mechanisms by which the NLRP3 inflammasome regulates blood-brain barrier permeability following cryptococcal meningitis[J]. *Heliyon*, 2024, 10(23): e39653.
- [4] Kim J, Lee KT, Lee JS, et al. Fungal brain infection modelled in a human-neurovascular-unit-on-a-chip with a functional blood-brain barrier[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(8): 830-46.
- [5] Zapata-Acevedo JF, Mantilla-Galindo A, Vargas-Sánchez K, et al. Chapter one blood-brain barrier biomarkers[J]. *Adv Clin Chem*, 2024, 121: 1-88.
- [6] Zheng ZJ, Zhu LZ, Qiu H, et al. Neferine inhibits BMECs pyroptosis and maintains blood-brain barrier integrity in ischemic stroke by triggering a cascade reaction of PGC-1 α [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 14438.
- [7] Han CY, Zhai LP, Shen HP, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) promote endothelial cell pyroptosis under cerebral ischemia and hypoxia via HIF-1 α -RAGE-NLRP3[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(5): 2355-66.
- [8] Gong Z, Gao X, Li Y, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonists prevent meningitic *Escherichia coli*-induced blood-brain barrier disruptions by targeting the CISH/JAK2/STAT5b axis[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(10): 2358.
- [9] Zhang ZL, Zou JH, Luo ZF, et al. NLRP3/caspase 1/gsdmd mediated pyroptosis exerts a crucial role in blood-brain barrier pathological injury induced by *Cryptococcus neoformans*[J]. *Blood*, 2023, 142: 5417.
- [10] Marcelo A, Koppenol R, de Almeida LP, et al. Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 592.
- [11] Zhang H, Mañán-Mejías PM, Miles HN, et al. DDX3X and stress granules: emerging players in cancer and drug resistance[J]. *Cancers: Basel*, 2024, 16(6): 1131.
- [12] Feng D, Guo L, Liu J, et al. DDX3X deficiency alleviates LPS-induced H9c2 cardiomyocytes pyroptosis by suppressing activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1389.
- [13] Wang Q, Kohls W, Wills M, et al. A novel stroke rehabilitation strategy and underlying stress granule regulations through inhibition of NLRP3 inflammasome activation[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(1): e14405.
- [14] Su X, Gao Y, Yang R. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites maintain gut and systemic homeostasis[J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2296.
- [15] Krishnan S, Ding YF, Saedi N, et al. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1099-111.
- [16] Huang ZB, Zhang GP, Lu CX, et al. Gut microbiota-derived 3-indoleacetic acid confers a protection against sepsis-associated encephalopathy through microglial aryl hydrocarbon receptors[J]. *Exp Neurol*, 2025, 384: 115055.
- [17] Zhao Q, Chen T, Ni C, et al. Indole-3-propionic acid attenuates HI-related blood-brain barrier injury in neonatal rats by modulating the PXR signaling pathway[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13(19): 2897-912.
- [18] Huang ZB, Hu Z, Lu CX, et al. Gut microbiota-derived indole 3-propionic acid partially activates aryl hydrocarbon receptor to promote macrophage phagocytosis and attenuate septic injury[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 1015386.
- [19] 李 猛, 左春月, 靳晓飞, 等. 补阳还五汤通过抑制脑微血管内皮细胞自噬减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2025, 41(3): 481-91.
- [20] 高加巍, 崔梦迪. 当归多糖调节 Caspase-1/Gasdermin D 通路促进脑缺血-再灌注损伤大鼠脑微血管内皮细胞血管新生[J]. *中药材*, 2024, 47(4): 977-83.
- [21] 张晋卿, 刘 伟, 谭静文, 等. 烟曲霉在不同温度和营养条件下的生长特性初探[J]. *中国真菌学杂志*, 2013, 8(1): 6-9.
- [22] Permpalung N, Chiang TP, Manothumetha K, et al. Invasive fungal infections in inpatient solid organ transplant recipients with COVID-19: a multicenter retrospective cohort[J]. *Transplantation*, 2024, 108(7): 1613-22.
- [23] Zhang B, Yu JY, Liu LQ, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is required for blood-brain barrier injury-related CNS disorders caused by *Cryptococcus neoformans* and HIV-1 associated comorbidity factors[J]. *BMC Infect Dis*, 2015, 15: 352.
- [24] Lun J, Li Y, Gao X, et al. Kynurenic acid blunts A1 astrocyte activation against neurodegeneration in HIV-associated neurocognitive disorders[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 87.
- [25] Tweedie A, Nissan T. Hiding in plain sight: formation and function of stress granules during microbial infection of mammalian cells[J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 647884.
- [26] Eiermann N, Haneke K, Sun Z, et al. Dance with the devil: stress granules and signaling in antiviral responses[J]. *Viruses*, 2020, 12(9): E984.
- [27] Samir P, Kesavardhana S, Patmore DM, et al. DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2019, 573(7775): 590-4.
- [28] Matsuki H, Takahashi M, Higuchi M, et al. Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation[J]. *Genes Cells*, 2013, 18(2): 135-46.
- [29] Tornavaca O, Chia M, Dufton N, et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation[J]. *J Cell Biol*, 2015, 208(6): 821-38.
- [30] Chen XY, Wan SF, Yao NN, et al. Inhibition of the immunoproteasome LMP2 ameliorates ischemia/hypoxia-induced blood-brain barrier injury through the Wnt/ β -catenin signalling pathway[J]. *Mil Med Res*, 2021, 8(1): 62.
- [31] Wang YJ, Guan X, Gao CL, et al. Medioresinol as a novel PGC-1 α activator prevents pyroptosis of endothelial cells in ischemic stroke through PPAR α -GOT1 axis[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105640.
- [32] Lopez-Pastrana J, Ferrer LM, Li YF, et al. Inhibition of Caspase-1 Activation in Endothelial Cells Improves Angiogenesis a novel therapeutic potential for ischemia[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(28): 17485-94.
- [33] Li P, Hu Y, Liu J, et al. *Naoluo Xintong* Decoction activates caspase-1/Gasdermin D pathway to promote angiogenesis of rat brain microvascular endothelial cells after oxygen glucose deprivation/reperfusion injury[J]. *Nan Fang Yi Ke da Xue Xue Bao*, 2023, 43(7): 1093-101.

(编辑:林 萍)