

NLRP3 炎性体在脑出血中的研究进展

孙勇, 张相彤 综述 梁洪生 审校

哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科, 黑龙江 哈尔滨 150000

摘要:脑出血是神经外科常见疾病,有很高的致残率、致死率,给家庭和社会带来沉重负担,目前缺乏有效的治疗手段。研究证实,脑出血后激活固有免疫系统,小胶质细胞活化并释放大量炎症因子,诱发无菌性炎症反应,引起脑组织继发性损伤,其中 NLRP3 炎性体在该过程中起重要作用。当前,关于 NLRP3 炎性体通路研究较多,但具体机制有待进一步阐明。本文对 NLRP3 炎性体信号通路及其在脑出血疾病中相关研究进展作一综述,旨在为脑出血疾病的基础研究和临床治疗提供依据。

关键词:炎性体;脑出血;炎症反应

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.021

脑出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是神经外科一种常见疾病,约占所有脑卒中类型的 10% ~ 15%,全球每年发病人数超过 2 亿,其高致残率、致死率给家庭和社会带来沉重负担^[1]。当前,脑出血后引起脑损伤的机制仍不完全清楚,临床上缺乏有效的治疗手段。脑出血后引起脑组织损伤的机制包括:血肿占位压迫、兴奋性神经毒性、氧化应激和炎症反应等。很多研究表明,无菌性炎症反应导致的神经元损伤是引起脑出血后继发性损伤的关键因素^[2]。脑出血后首先激活固有免疫系统,表现为血肿周围聚集大量的炎症细胞,包括神经系统所固有的小胶质细胞和星形胶质细胞,以及来源于血管渗出的中性粒细胞、巨噬细胞等^[3]。浸润的炎症细胞释放大量的炎症因子、自由基和其他有毒性物质进一步加重神经细胞损伤,进而影响脑出血患者的预后^[4]。其中,小胶质细胞最早出现在血肿周围,是中枢神经系统重要的免疫细胞,主要参与中枢神经系统的固有免疫反应^[5]。

1 NLRP3 炎性体概述

一般情况下,炎症反应是机体免疫系统为清除有害刺激,并促进组织损伤修复的一种保护性病理生理过程,然而过度的炎症反应对机体会造成损害。在固有免疫系统中,机体主要通过模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 识别外源性或内源性刺激,进而启动炎症反应并介导细胞内炎症

因子释放。PRR 可识别特定的病原相关分子模式 (PAMPs) 或损伤相关分子模式 (DAMPs),根据受体在细胞分布部位不同,PRR 可分为两类:一类是位于细胞膜的膜结合受体,如 Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs); 另一类是位于胞浆内的核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 样受体 (nucleotide-binding-oligomerization domain like receptors, NLRs)^[6]。

NLRs 是一种结构上高度保守的胞浆内受体家族,NLRP3 是其典型代表,广泛参与宿主抗感染的免疫防御反应及无菌性炎症反应。当外源性或内源性刺激物激活 NLRP3 后,可通过 N 端热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD) 与衔接蛋白即凋亡相关斑点蛋白 (apoptosis associated speck-like protein, ASC) 结合,衔接蛋白 ASC 募集效应蛋白半胱氨酸天冬氨酸酶-1 前体 (pro-caspase-1),从而形成由 NLRP3/ASC/pro-caspase-1 组成的复杂蛋白复合物,称为 NLRP3 炎性体^[7]。

NLRP3 炎性体在很多疾病发生发展中起着重要作用,如病原体感染、2 型糖尿病、动脉粥样硬化性、阿尔兹海默病、脑缺血再灌注损伤等^[8]。近几年 NLRP3 炎性体在脑出血疾病中研究逐渐增多,明确 NLRP3 炎性体在脑出血后无菌性炎症反应中的具体机制有重要意义,本文就 NLRP3 炎性体激活机制及其在脑出血疾病中的研究进展作一综述。

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (81571108)

收稿日期:2016-11-03; **修回日期:**2017-01-13

作者简介:孙勇 (1990-),男,在读硕士,主要从事脑出血的基础与临床研究。

通信作者:张相彤 (1967-),男,医学博士,主任医师,教授,主要从事脑出血的基础与临床研究。

2 NLRP3 炎性体活化机制

2.1 NLRP3 炎性体活化的经典通路

经典途径中,外源性或内源性刺激物作用于 NLRP3,促进形成 NLRP3 炎性体,随后 pro-caspase-1 被剪切为有活性的半胱氨酸天冬氨酸酶-1 (caspase-1),活化的 caspase-1 剪切 IL-1 β 及 IL-18 前体,产生成熟的 IL-1 β 及 IL-18 并分泌到细胞外,进而导致细胞损伤或死亡^[9,10](图 1A)。该途径中,NLRP3 可被革兰氏阳性菌(G⁺菌)、病毒、孔毒素、晶体物质(如 ATP、二氧化硅、明矾)等激活。研究者认为这些物质并不能直接作用于 NLRP3 炎性体,而是通过一种或多种下游细胞生物学事件起激活作用^[11]。目前公认的激活 NLRP3 炎性体机制包括:钾离子外流、线粒体活性氧的作用、溶酶体破裂后组织蛋白酶的释放、线粒体损伤后线粒体 DNA 或心磷脂的释放、线粒体易位^[12,13]。另外,双链 RNA(dsRNA)激活的蛋白激酶 R(PKR)、相关死

亡结构域(Fas Associated Death Domain, FADD)和 caspase-8 等,是否与 NLRP3 炎性体激活有关仍存在争议^[14-16]。研究证实,白细胞分化抗原 CD36 在 NLRP3 介导的无菌性炎症反应中起一定作用。CD36 的可溶性配体,如晶体或者纤维状态的氧化修饰的低密度脂蛋白(LDL),可促进 NLRP3 炎性体的激活^[17]。此外,NLRP3 的去泛素化也是其激活的必备条件^[18]。

实验证实,RNA 和线粒体 DNA 也可激活 NLRP3^[12]。最近一项研究表明,RNA 病毒诱导形成丝氨酸/苏氨酸激酶 RIP1 和 RIP3 复合体,该复合体启动并激活 GTP 酶 DRP1,使线粒体发生易位,导致线粒体损伤,进而激活 NLRP3^[19]。近期研究证实,细菌感染后其复制过程中形成的 RNA:DNA 聚合物是导致 NLRP3 激活的第三类核酸^[15]。在核酸激活 NLRP3 过程中,其能否直接与 NLRP3 起作用或通过核酸结合蛋白而发挥功能,目前仍不清楚。

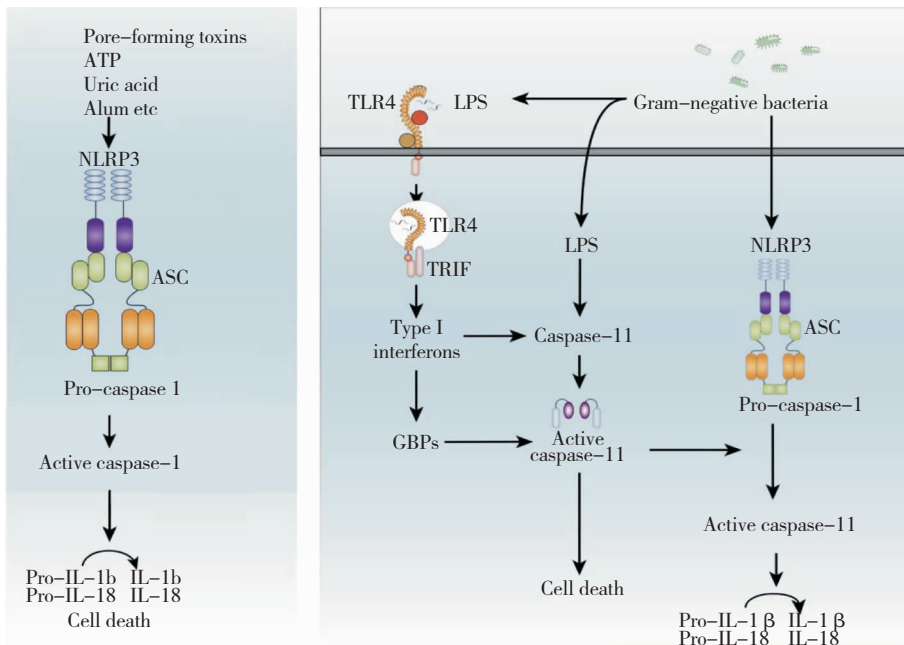


图 1 NLRP3 炎性体活化的经典及非经典通路(A 经典通路;B 非经典通路)(引自参考文献 10)

2.2 NLRP3 炎性体活化的非经典通路

目前发现,细菌脂多糖(LPS)可通过非经典途径激活 NLRP3 炎性体通路,具体机制为:LPS 可促进 NLRP3 炎性体组装,但 NLRP3 炎性体不能直接活化 caspase-1。同时 LPS 与细胞膜受体 TLR4 结合,产生 I 型干扰素,后者促进细胞合成 caspase-11 和鸟苷酸结合蛋白(GBPs)。LPS 进入胞液中直接结合 caspase-11 导致其活化,且 GBPs 也可促进

caspase-11 激活。活化的 caspase-11 促进 NLRP3 炎性体剪切 pro-caspase-1,进而成熟的 caspase-1 促进 IL-1 β /IL-18 产生并发挥生物学效应。同时,活化的 caspase-11 也可直接引起细胞死亡^[10,20](图 1B)。

通常情况下,固有免疫系统需要通过受体识别刺激信号才能导致炎性体装配,然后促进 caspases 剪切活化。然而,caspase-11 的活化能独立地发生

在很多已知炎症体中(包括 NLRP3、NLRC4 和 NLRP6)^[21]。研究者认为,caspase-11 是胞液内 LPS 的直接受体,caspase-11 结合 LPS 后自身寡聚化,进而活化发挥生物学功能。虽然人类缺乏 caspase-11,但研究发现,人类中的 caspase-4 和 caspase-5 类似于 caspase-11 的作用,可直接结合 LPS 并触发细胞死亡^[20,21]。和其他 caspases 不同,caspase-11 在稳定的环境中表达量很低,I 型干扰素可促进 caspase-11 合成,其介导的 STAT1-IRF9 活化是上调 caspase-11 表达的主要机制^[20,22]。此外,I 型干扰素通过它在 GBPs 中的作用来活化 caspase-11,然而关于 GBPs 调控 caspase-11 通路确切机制尚不清楚。虽然 caspase-11 可调控细胞死亡,但确切机制仍不明了,caspase-11 可以与 caspase-1 相互作用,但是 NLRP3-ASC 复合体的装配似乎没有 caspase-11 的参与。非经典通路有深刻的生物学意义,caspase-11 缺陷的小鼠可明显地免受内毒素休克致命的影响,然而在全身性感染中 caspase-11 具有保护作用,可能是源于它诱导细胞死亡能力强于 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[20]。这些研究结果表明 caspase-11 激活的调节异常对机体是有害的。

3 NLRP3 炎症体与脑出血关系

众多研究表明,脑出血后引起的无菌性炎症反应在继发性脑损伤中起重要作用^[2,23]。到目前为止,研究人员已经证实,在人类和动物脑出血后血肿周围可以检测到大量的炎症因子,如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等,其中 IL-1 β 在众多炎症因子中起着关键的作用,参与细胞的多项功能并促进其他炎症因子的合成与释放^[24]。实验证实,在脑出血后血肿周围的小胶质细胞中 NLRP3 激活并形成 NLRP3 炎症体,促进 caspase-1 活化并导致 IL-1 β /IL-18 表达增高,诱发及加剧无菌性炎症反应^[25-30]。目前关于 NLRP3 炎症体在脑出血中的研究,主要是针对 NLRP3 和 caspase-1。

作为一种蛋白质多聚复合物,NLRP3 炎症体激活及调控机制在脑出血疾病中尚不清楚。Chen 等^[25]在 VII 型胶原酶诱导 SD 大鼠脑出血模型中研究发现,血肿周围的小胶质细胞中离子通道受体 P2X7 (P2X7R)、NLRP3/ASC/caspase-1、IL-1 β /IL-18 表达增高,当使用小干扰 RNA (siRNA) 沉默 P2X7R 基因后表达量则降低,并能显著减轻脑水肿及改善神经功能缺失。此外,脑出血后使用选择性 P2X7R 抑制剂治疗,可明显降低 NADPH 氧化酶

2 (NOX2)、诱生型一氧化氮合酶 (iNOS)、过氧亚硝基 (ONOO-) 和过氧化物酶 (MPO) 的表达量,能抑制中性粒细胞浸润,同时伴随着 NLRP3/ASC/caspase-1 和炎症产物 IL-1 β /IL-18 降低,同样可减轻大鼠脑水肿程度并通过抑制神经元凋亡而改善神经功能。使用 ONOO-的促分解物 FeTPPS 时,亦可抑制 NLRP3 激活,并降低 IL-1 β /IL-18 水平。这些研究结果表明,大鼠脑出血后,P2X7R 在激活 NLRP3 炎症体通路中起重要作用。ONOO-作为 P2X7R 的下游信号分子在诱发 NLRP3 炎症体激活过程中可能起关键作用,其可能机制如下:①线粒体被 ONOO-氧化损伤后释放线粒体 DNA,激活 NLRP3 炎症体^[12];②其硝化作用导致硫氧还原蛋白结合蛋白 (TXNIP) 与硫氧还原蛋白分离,TXNIP 结合 NLRP3 后激活其炎症体通路;③ONOO-可能通过增强钾离子外流而激活 NLRP3^[11]。因此,抑制 P2X7R 或 ONOO-可能成为治疗脑出血后二次脑损伤的靶点。Tang 等^[26]在注射自体动脉血诱导小鼠脑出血模型中研究发现,NLRP3/caspase-1、IL-1 β 升高的同时,伴随着线粒体通透性转换孔形成和线粒体活性氧增加。而敲除 NLRP3 基因可降低过氧化物酶水平,抑制中性粒细胞浸润,减轻脑出血后 24h 脑水肿程度,改善脑出血后 24h、72h 的神经功能,同时 NLRP3/caspase-1、IL-1 β 下降。此外,使用阴离子通道 (VDAC) 抑制物 (TRO-19622) 或线粒体活性氧清除剂 (Mito-TEMPO),可通过抑制活性氧 (ROS) 产生而起到同样作用。同时,在幼鼠研究中发现,鱼藤酮可诱导线粒体通透性转换孔形成,促进活性氧生成,导致 NLRP3 炎症体激活,然而使用 TRO-19622 或 Mito-TEMPO 后可抑制此过程。该研究表明,在脑出血中,线粒体活性氧产生可能是激活 NLRP3 的关键因素。有学者研究发现^[27],脑出血后天门冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 增高,而使用天门冬氨酸受体拮抗剂 (MK801) 可以抑制脑出血后 NLRP3 表达,说明 NMDAR1 可能在 NLRP3 炎症体激活通路中起一定的协同作用,其有待进一步研究。

调控基因表达的微小 RNA (microRNA) 是研究最多的非编码 RNA,其通过调节转录后水平在多种病理生理过程中发挥重要作用^[31]。Yuan 等^[28]在 C57BL/6 小鼠脑出血模型中发现,microRNA-223 (miR-223) 可以调控 NLRP3 表达并影响炎症反应。研究表明,NLRP3 的 mRNA 3' 端非编码固定区

域存在 miR-223 可结合位点,并且 miR-223 可直接通过该区域来调控 NLRP3 的表达。其研究结果指出,脑出血后小胶质细胞激活,miR-223 可下调小胶质细胞中 NLRP3 的表达,减少 caspase-1、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的产生,从而抑制炎症反应和神经损伤,减轻脑水肿及改善神经功能。该研究提示,miR-223 可通过抑制 NLRP3 炎性体激活而减轻炎症损害,但是否还存在其他机制尚不清楚。Yang 等^[29]研究发现,在体外,使用重组腺病毒编码的 NLRP3 干扰 RNA (NLRP3 RNAi) 可抑制小胶质细胞引起的炎症反应 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 分泌减少),并且能增加神经元活性、减少神经元凋亡。体内干预实验中,在脑出血后 48h 血肿周围脑组织中也得到了同样结果 (NLRP3、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达量降低),并显著减轻脑水肿和改善神经功能。

Caspase-1 作为 NLRP3 炎性体的效应分子,在该炎性体通路介导的炎症反应中发挥着重要作用。有学者^[30]在诱导 CD-1 成年雄性小鼠脑出血前 20min,通过侧脑室微量注射选择性 caspase-1 抑制剂 Ac-YVAD-CMK,发现 Ac-YVAD-CMK 治疗组能显著地减轻脑水肿并改善神经系统功能。其神经保护作用可能与下调 IL-1 β 、磷酸化 JNK 激酶、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 以及抑制紧密连接蛋白 ZO-1 的降解有关。结果表明 Ac-YVAD-CMK 可通过抑制 caspase-1 活化,减轻炎症导致的血脑屏障损害,从而减轻脑组织损伤,其具体机制有待进一步阐明。

4 总结及展望

脑出血是一种常见急症,过度的无菌性炎症反应是引起脑出血继发性损害的主要因素,而 NLRP3 炎性体在无菌性炎症反应中起重要作用。尽管对 NLRP3 炎性体研究较多,但其在脑出血疾病中具体机制尚未阐明。P2X7R 的活化可能仅为 NLRP3 炎性体激活的众多机制之一。微小 RNA (miR-223) 是否可以通过其他分子,对 NLRP3 炎性体产生进一步影响尚不清楚。除 NLRP3 炎性体通路外,miR-223 也可能通过其他途径对脑出血后炎症反应起调控作用。尽管 Ac-YVAD-CMK 为 caspase-1 选择性抑制剂,但也对其他 caspase 蛋白起一定作用。对于阻断 NLRP3 炎性体通路而减轻炎症反应,是否影响坏死组织清除或降低免疫力,有待更长期的实验观察。同时,在胶原酶诱导的脑出血模型中,其本身所引起的炎症反应无法避免。我们推

测,适度控制炎症反应能减轻脑出血后继发性损伤并改善预后,过度的抑制炎症反应可能会影响坏死组织清除或增加感染的可能。在脑出血疾病中,针对 NLRP3 炎性体不同靶点的研究有待完善及进一步验证,为临床治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Al-khaled M, Eggers J. Prognosis of intracerebral hemorrhage after conservative treatment [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(2): 230-234.
- [2] Zhou Y, Wang Y, Wang J, et al. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation [J]. Prog Neurobiol, 2014, 115: 25-44.
- [3] Ransohoff, RM, Brown, MA. Innate immunity in the central nervous system [J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1164-1171.
- [4] Yang Z, Liu B, Zhong L, et al. Toll-like receptor-4-mediated autophagy contributes to microglial activation and inflammatory injury in mouse models of intracerebral haemorrhage [J]. Neuropathol Appl Neurobiol. 2015, 41(4): e95-106.
- [5] Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS [J]. Nat Rev Neurosci. 2014, 15(2): 84-97.
- [6] Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, et al. Inflammasomes in health and disease [J]. Nature. 2012, 481(7381): 278-286.
- [7] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. Cell. 2010, 140:821-832.
- [8] Kastbom A, Årlestig L, Rantapää-Dahlqvist S. Genetic variants of the NLRP3 inflammasome are associated with stroke in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Rheumatol. 2015, 42(10): 1740-1745.
- [9] Rathinam VA, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling [J]. Nat Immunol. 2012, 13(4): 333-342.
- [10] Vanaja SK, Rathinam VA, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights [J]. Trends Cell Biol. 2015, 25(5): 308-315.
- [11] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes [J]. Cell. 2014, 157(5): 1013-1022.
- [12] Shimada K, Crother TR, Karlin J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis [J]. Immunity. 2012, 36(3): 401-414.
- [13] Ermler ME, Traylor Z, Patel K, et al. Rift Valley fever virus infection induces activation of the NLRP3 inflammasome [J]. Virology. 2014, 449: 174-180.
- [14] He Y, Franchi L, Núñez G. The protein kinase PKR is critical for LPS-induced iNOS production but dispensable for in-

- flammasome activation in macrophages [J]. Eur J Immunol. 2013, 43 (5) : 1147-1152.
- [15] Kailasan Vanaja S, Rathinam VA, Atianand MK, et al. Bacterial RNA : DNA hybrids are activators of the NLRP3 inflammasome [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2014, 111 (21) : 7765-7770.
- [16] Gurung P, Anand PK, Malireddi RK, et al. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes [J]. J Immunol. 2014, 192 (4) : 1835-1846.
- [17] Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. Nat Immunol. 2013, 14 (8) : 812-820.
- [18] Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity [J]. Mol Cell. 2013, 49 (2) : 331-338.
- [19] Wang X, Jiang W, Yan Y, et al. RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway [J]. Nat Immunol. 2014, 15 (12) : 1126-1133.
- [20] Aachoui Y, Leaf IA, Hagar JA, et al. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole [J]. Science. 2013, 339 (6122) : 975-978.
- [21] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4 [J]. Science. 2013, 341 (6151) : 1246-1249.
- [22] Casson CN, Copenhaver AM, Zwack EE, et al. Caspase-11 activation in response to bacterial secretion systems that access the host cytosol [J]. PLoS Pathog. 2013, 9 (6) : e1003400.
- [23] Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage [J]. Prog Neurobiol. 2010, 92 (4) : 463-477.
- [24] Patterson SL. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain : Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity [J]. Neuropharmacology. 2015, 96 (PtA) : 11-18.
- [25] Feng L, Chen Y, Ding R, et al. P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and brain injury in a rat model of intracerebral hemorrhage : involvement of peroxynitrite [J]. J Neuroinflammation. 2015, 12 : 190.
- [26] Tang J, Chen S, Hu Q, et al. NLRP3 Inflammasome Contributes to Inflammation after Intracerebral Hemorrhage [J]. Ann Neurol. 2014, 75 (2) : 209-219.
- [27] Weng X, Tan Y, Chu X, et al. N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 (NMDAR1) aggravates secondary inflammatory damage induced by hemin-NLRP3 pathway after intracerebral hemorrhage [J]. Chin J Traumatol. 2015, 18 (5) : 254-258.
- [28] Yuan B, Zhong L, Xian R, et al. MicroRNA-223 regulates inflammation and brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage [J]. Mol Immunol. 2015, 65 (2) : 267-276.
- [29] Su T, Zhong S, Yang Z, et al. Recombinant adenovirus encoding NLRP3 RNAi attenuate inflammation and brain injury after intracerebral hemorrhage [J]. J Neuroimmunol. 2015, 287 : 71-75.
- [30] Sozen T, Cheng O, Tang J, et al. Ac-YVAD-CMK Decreases Blood-Brain Barrier Degradation by Inhibiting Caspase-1 Activation of Interleukin-1 β in Intracerebral Hemorrhage Mouse Model [J]. Transl Stroke Res. 2010, 1 (1) : 57-64.
- [31] Cabarcas SM, Thomas S, Zhang X, et al. The role of upregulated miRNAs and the identification of novel mRNA targets in prostatospheres [J]. Genomics. 2012, 99 (2) : 108-117.