

# NLRP3 炎症小体激活及调节机制的研究进展

丁杨, 胡容\*

(中国药科大学基础医学与临床药学院, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 炎症小体是一种由 Nod 样受体 (NLR) 家族成员与 PYHIN (pyrin and HIN domain) 家族成员组成的胞浆多蛋白复合物, 能被多种病原相关分子模式或损伤相关分子模式激活。炎症小体的功能是激活半胱天冬酶 1 (Caspase-1), 进而引起促炎细胞因子白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟和分泌, 并诱导细胞焦亡。NLR 家族蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体是由 NLRP3、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 Caspase-1 组成的大分子多蛋白复合物。与其他炎症小体不同, NLRP3 炎症小体可以被多种刺激物活化, 包括微生物组分和内生性分子。NLRP3 炎症小体在免疫系统和人类疾病中的重要性显而易见, 但其激活及调节的机制仍不清楚。在此, 主要对 NLRP3 炎症小体活化和调节的机制进行综述。

**[关键词]** NLRP3 炎症小体; 激活; K<sup>+</sup> 外流; Ca<sup>2+</sup> 信号; 活性氧簇; 溶酶体

**[中图分类号]** R966

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094 (2018) 04-0294-09

## Research Progress in Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Activation and Regulation

DING Yang, HU Rong

(School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** Members of nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat (LRR) -containing (NLR) family and the pyrin and HIN domain (PYHIN) family can form cytoplasmic multiprotein complexes termed "inflammasomes", which can be activated by diverse pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs). The function of inflammasomes is to activate Caspase-1, which leads to the maturation and secretion of pro-inflammatory cytokines interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) and IL-18 and induces pyroptosis, a form of cell death. The NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome is a multiprotein complex consisted of NLRP3, ASC and Caspase-1. Unlike other inflammasomes, the NLRP3 inflammasome can be activated by diverse stimuli, including bacterial products and endogenous molecules. The importance of the NLRP3 inflammasome in immunity and human diseases has been well documented, but the mechanisms of its activation and regulation remain unclear. In this review we summarized current understanding of the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and regulation.

**[Key words]** NLRP3 inflammasome; activation; K<sup>+</sup> efflux; Ca<sup>2+</sup> signaling; ROS; lysosome

炎症小体是一种胞浆多蛋白复合物, 主要介导宿主对微生物感染和细胞损伤的免疫反应。炎症小体的聚集引起半胱天冬酶原 (pro-Caspase-1) 蛋白裂解, 生成活化的半胱天冬酶 1 (Caspase-1), Caspase-1 又促使细胞因子前体白细胞介素 1 $\beta$  前体 (pro-interleukin-1 beta, pro-IL-1 $\beta$ ) 和白细胞介素 18 前体 (pro-interleukin-18, pro-IL-18) 转变为成熟的 IL-1 $\beta$  和 IL-18。在很多免疫反应中, 成熟的 IL-1 $\beta$  是有效的促炎介质, 能将先天性免疫细胞招募至感染部位, 并调节获得性免疫细胞, 而成熟的 IL-18 能够促进干扰素  $\gamma$  (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 的生成, 增强自然杀伤细胞和 T 细胞的杀伤活性。活化的 Caspase-1 能诱导促炎形式的细胞死

亡, 即细胞焦亡。炎症小体的组成包括模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR)、凋亡相关斑点样蛋白 [apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain (CARD), ASC] 以及半胱氨酸蛋白酶 Caspase-1<sup>[1]</sup>。

参与病原体识别的 PRRs 主要有 4 种: Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)、Nod 样受体 (Nod-like receptors, NLRs)、RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptors, RLRs) 和 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors)。这些 PRRs 能够识别保守的微生物结构单元或病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMPs), 如细菌细胞壁的成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或肽聚糖; 也能识别细胞或组织损伤产生的损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs), 如腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP)。TLRs 通常定位于细胞外表面和体内上, 而 NLRs 定位于

接受日期: 2018-01-02

\*通讯作者: 胡容, 教授;

研究方向: 肿瘤药理学;

Tel: 025-83271089; E-mail: ronghu@cpu.edu.cn

胞浆, 识别进入细胞内环境的 PAMPs 和 DAMPs<sup>[2]</sup>。迄今为止, 已发现 5 种能够形成炎症小体的 PRRs[NLR 家族蛋白 (NLRP1)、NLRP3、NLRC4、Pyrin 和 AIM2]。

NLRP3 炎症小体活化引起的促炎细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌, 以及细胞焦亡是机体的一种自我保护措施, 可帮助抵抗外源性的微生物感染和内源性的细胞损伤, 维持自身内环境稳态。同时, NLRP3 炎症小体也参与糖尿病、动脉粥样硬化、痛风等多种疾病的发生发展, 使临床病症和治疗更加复杂<sup>[3]</sup>。本文通过介绍 NLRP3 炎症小体激活和调节机制的研究进展, 不仅有助于了解炎症的病理生理过程, 而且有助于为 NLRP3 炎症小体相关的疾病治疗提供理论依据, 为新药开发提供作用靶标参考。

## 1 NLRP3 炎症小体

在所有的炎症小体中, NLRP3 炎症小体与痛风、2 型糖尿病、阿尔茨海默病等多种疾病密切相关<sup>[3]</sup>。NLRP3 炎症小体是由 NLRP3、接头蛋白 ASC 和效应蛋白 Caspase-1 组成的一种相对分子质量约为 700 000 的

大分子多蛋白复合体。

### 1.1 核心蛋白 NLRP3

NLRP3 属于 NLRs 蛋白家族, 该家族包含 22 个人源蛋白和至少 34 个鼠源蛋白。大多数 NLRs 的结构由 3 个部分组成: 氨基端 Caspase 招募区 (CARD)、热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD)、酸性反式激活域或 BIR 结构域 (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain, BIR), 主要介导下游蛋白间相互作用; 中间的核苷酸结合和寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NACHT, 包括 NAIP、CIITA、HET-E 和 TP1 蛋白), 主要介导自身寡聚化; 碳端的亮氨酸重复序列 (leucine-rich repeats, LRRs), 主要参与识别刺激。正常生理条件下, NLRP3 的 NACHT 结构域与 LRRs 结合, 使其处于自我抑制状态。当出现 PAMPs 或 DAMPs 时, NLRP3 解除自我抑制状态, 暴露 NACHT 结构域, 发生寡聚化, NLRP3 氨基端的 PYD 结构域招募含有 PYD 的 ASC 接头蛋白, ASC 的 CARD 结构域招募含有 CARD 的 pro-Caspase-1, 完成炎症小体的组装 (见图 1)。

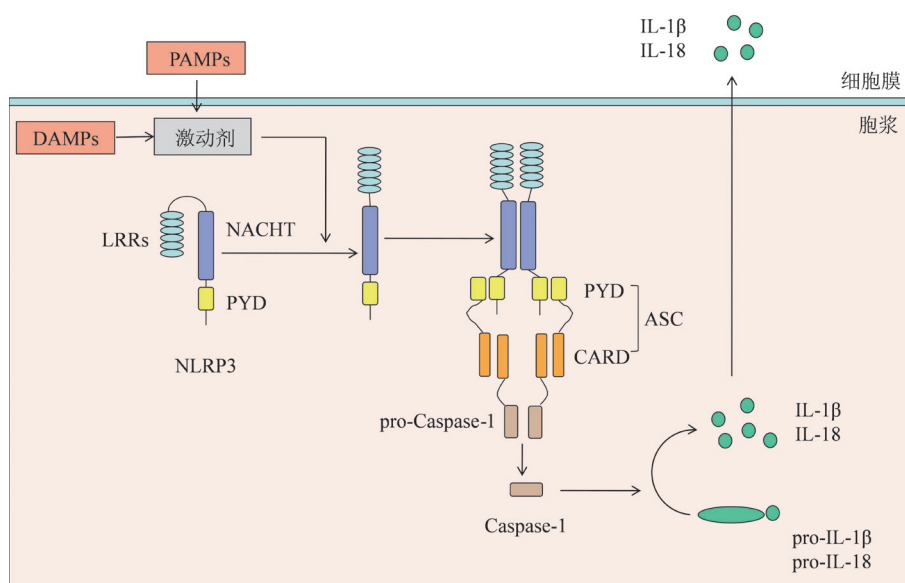


图 1 NLRP3 炎症小体的结构及组装

Figure 1 The structure and formation of NLRP3 inflammasome

### 1.2 接头蛋白 ASC

ASC 是相对分子质量约为 22 000 的接头蛋白, 由 PYD 和 CARD 组成。ASC 主要分布于人单核/巨噬细胞核, 应激时迅速转移至胞浆, 连接 NLRP3 和 pro-Caspase-1, 促进 NLRP3 炎症小体的激活。

### 1.3 效应蛋白 Caspase-1

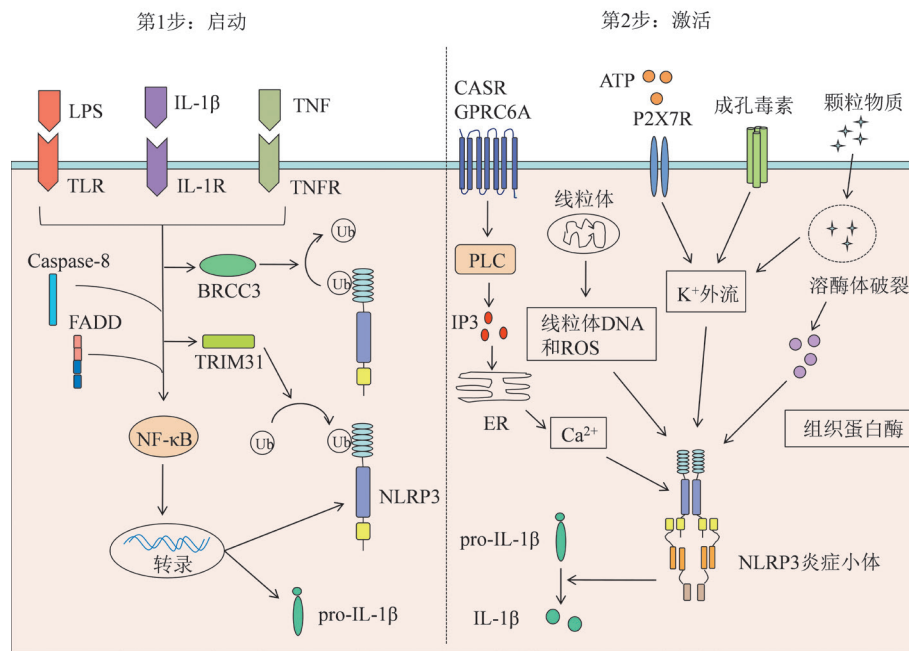
Caspase-1 又称为 IL-1 $\beta$  转化酶, 是 NLRP3 炎症小体的效应蛋白。由前体分子 pro-Caspase-1 自身裂解, 形成有活性的 Caspase-1, 即 p20 和 p10 这 2 个亚单位, 促进 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 剪切为成熟的

IL-1 $\beta$  和 IL-18。

## 2 NLRP3 炎症小体的活化

大多数微生物刺激, 如 TLRs 的配体, 并不能直接激活 NLRP3 炎症小体, 而是为其激活做准备工作。而在 ATP、成孔毒素或颗粒物诱导 NLRP3 激活之前, 需要微生物刺激或细胞因子对巨噬细胞进行预

处理。因此, 巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体的激活需要 2 步反应: 第 1 步 (启动) 是微生物或内源性的分子促进核因子 (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 入核, 调控 NLRP3 和 pro-IL-1 $\beta$  转录表达; 第 2 步 (激活) 由 ATP、成孔毒素、病毒 RNA 或颗粒物引起, 通过多种细胞和分子效应, 促进炎症小体组装, 介导 pro-IL-1 $\beta$  剪切成熟 (见图 2)。



LPS: lipopolysaccharide, 脂多糖; IL-1R: interleukin-1 receptor, 白细胞介素 1 受体; TNF: tumor necrosis factor, 肿瘤坏死因子; TNFR: tumor necrosis factor receptor, 肿瘤坏死因子受体; Caspase-8: 半胱天冬酶 8; FADD: FAS-associated death domain protein, FAS 相关死亡结构域蛋白; BRCC3: 63 位赖氨酸特异的去泛素酶 BRCC36; TRIM31: tripartite motif 31, 三结构域蛋白 31; Ub: ubiquitin, 泛素; CASR: calcium-sensing receptor, 钙感受受体; GPRC6A: G protein-coupled receptor, family C, group 6, subtype A, G 蛋白偶联受体 C 家族 6 组成员 A; PLC: phospholipase C, 磷脂酶 C; IP3: 1,4,5-trisphosphate, 1,4,5-三磷酸肌醇; ER: endoplasmic reticulum, 内质网; ROS: reactive oxygen species, 活性氧簇; P2X7R: purinergic receptor, 嘌呤能受体。

图 2 NLRP3 炎症小体的双信号激活模型

Figure 2 A two-signal model for NLRP3 inflammasome activation

### 2.1 NLRP3 炎症小体的启动

当用 NLRP3 的激动剂直接刺激巨噬细胞 (如小鼠的髓系巨噬细胞) 时, NLRP3 炎症小体不激活或仅有少量激活, 然而用细菌配体预处理后, NLRP3 炎症小体的激活会明显增强, 该预处理的过程称之为启动步骤, 为 NLRP3 炎症小体的激活提供第一信号。与 ASC 和 Caspase-1 不同, 休眠期的巨噬细胞中 NLRP3 蛋白表达较低, 不足以激活炎症小体。启动阶段, 细菌组分如 TLR 的配体, 或内源性分子如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 和 IL-1 $\beta$ , 通过激活 NF- $\kappa$ B, 诱导 NLRP3 蛋白的表达。近来研究发现, FAS 相

关死亡结构域蛋白 (FAS-associated death domain protein, FADD) 和 Caspase-8 也能调节启动阶段 NLRP3 的表达<sup>[4-5]</sup>。在缺乏启动步骤时, 通过逆转录病毒使巨噬细胞高表达 NLRP3, 再给予激动剂刺激, 也能够增强炎症小体的激活<sup>[6]</sup>。因此, 启动阶段通过诱导 NLRP3 蛋白的表达, 可促进炎症小体的激活。

NLRP3 蛋白表达是炎症小体激活的限速步骤。研究发现, 启动后的巨噬细胞在短时间内 (10 min), 无法诱导 NLRP3 蛋白的表达, 却显著增强了炎症小体的激活<sup>[6-7]</sup>。由此可见, 启动阶段对炎症小体激活的调节作用不仅仅依赖于转录调控, 也依赖于转录后修饰。

通过对 NF- $\kappa$ B 通路信号分子缺陷的小鼠巨噬细胞进行研究, 髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88)、下游的激酶如 IL-1 受体相关激酶 1 (IL-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) 和 IRAK4 与 NLRP3 激活的转录调节有关, 而  $\beta$  干扰素 TIR (Toll/IL-1 receptor) 结构域衔接蛋白 (TIR-domain-containing adaptor inducing interferon-beta, TRIF) 和 IRAK1 在启动阶段的转录后修饰中起到了重要作用<sup>[8-9]</sup>。此外, 泛素化过程也参与调节 NLRP3 的转录后修饰。在启动阶段, E3 泛素连接酶 TRIM31 碳端的卷曲螺旋结构与 NLRP3 的 PYD 结构域结合, 促使 NLRP3 蛋白发生 K48 连接的多聚泛素化及蛋白酶体降解, 从而抑制 NLRP3 炎症小体的激活<sup>[10]</sup>。而 BRCC3, 以及包含 JAMM 域的 Zn<sup>2+</sup> 金属蛋白酶可促进 NLRP3 的去泛素化, 并诱导 NLRP3 的激活<sup>[11-12]</sup>。泛素化过程涉及的蛋白酶种类较多, 相关的泛素酶对 NLRP3 炎症小体激活的作用各异, 因此泛素化过程对 NLRP3 激活的作用十分复杂, 虽然近来针对泛素化修饰的研究渐多, 但其对于 NLRP3 炎症小体激活的确切作用仍未有定论。简而言之, 多种泛素酶综合调节 NLRP3 炎症小体的激活, 共同维持内环境的稳态。

## 2.2 NLRP3 炎症小体的激活

鉴于 NLRP3 激动剂化学结构的多样性, NLRP3 与其激动剂之间不大可能是物理性相互作用, NLRP3 可能是通过感受其激动剂诱导的细胞内信号而活化的。近来, 该信号机制引起了广泛的争论。一些分子和细胞效应被认为是 NLRP3 炎症小体激活的触发剂, 包括 K<sup>+</sup> 外流、Ca<sup>2+</sup> 信号、ROS、线粒体功能失调和溶酶体破裂。

**2.2.1 K<sup>+</sup> 外流对 NLRP3 炎症小体激活的作用** 早期报道提出, 在 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞中, K<sup>+</sup> 载体如尼日利亚菌素, 能引起 IL-1 $\beta$  的成熟和分泌<sup>[13]</sup>。随后的研究也证实了 K<sup>+</sup> 外流在 NLRP3 炎症小体激活过程中的重要性: 高浓度的细胞外 K<sup>+</sup> 能抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 但不影响 AIM2 (absent in melanoma 2) 和 NLRC4 (NLR-family CARD-containing protein 4) 等炎症小体的激活; 大多数 NLRP3 的激动剂都能引起 K<sup>+</sup> 外流, 包括 ATP、尼日利亚菌素和颗粒物, 降低细胞内 K<sup>+</sup> 浓度就足以激活 NLRP3 炎症小体<sup>[14]</sup>。另有研究显示, 低浓度的 K<sup>+</sup> 也可以在无细胞的体系中引起 NLRP3 炎症小体的聚集<sup>[15]</sup>。因此, 相关研究显示细胞内 K<sup>+</sup> 浓度的降低被认为是 NLRP3 炎症小体激活的共同机制<sup>[14]</sup>。

然而, 细胞内 K<sup>+</sup> 浓度的降低与 NLRP3 活化的关联性仍未研究清楚。在没有 K<sup>+</sup> 外流的情况下, NLRP3 激活突变 (NLRP3<sup>R258W</sup>) 的巨噬细胞中, NLRP3 炎症小体能够正常活化, 且不被细胞外高浓度的 K<sup>+</sup> 影响<sup>[14]</sup>。这表明, 细胞内 K<sup>+</sup> 浓度的降低可能造成 NLRP3 构象的改变, 且这种改变与 NLRP3 激活突变引起的构象改变一致。NLRP3 通过感受细胞内 K<sup>+</sup> 浓度降低的信号, 改变自身构象, 发生寡聚化, 完成炎症小体的组装, 促进 pro-Caspase-1 蛋白裂解, IL-1 $\beta$  和 IL-18 分泌, 以及细胞焦亡, 但是, 该设想还未得到公认, NLRP3 构象改变的具体位点和形式, 细胞内 K<sup>+</sup> 浓度降低对 NLRP3 活化的其他影响, 以及 K<sup>+</sup> 浓度降低引起 NLRP3 激活的阈值, 这些疑问在深入探究 K<sup>+</sup> 外流与 NLRP3 活化的关联时, 不可忽略。

**2.2.2 Ca<sup>2+</sup> 信号与 NLRP3 炎症小体激活** 研究发现, Ca<sup>2+</sup> 螯合剂 1,2-二(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸四乙酰氧甲基酯 (BAPTA-AM) 能抑制 IL-1 $\beta$  的分泌, 因而推测 Ca<sup>2+</sup> 信号可能参与了 NLRP3 炎症小体的激活<sup>[16]</sup>。ATP、尼日利亚菌素和颗粒物等刺激物在激活 NLRP3 炎症小体的过程中, 都能引起钙调动。研究显示, 抑制 Ca<sup>2+</sup> 信号可以阻断 NLRP3 炎症小体的激活, 但不影响 AIM2 和 NLRC4 等炎症小体的激活; 内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 作为细胞内的主要钙库, 对 Ca<sup>2+</sup> 信号参与 NLRP3 炎症小体激活的过程有重要作用, 敲除或药理抑制内质网上的 Ca<sup>2+</sup> 释放通道, 即 1,4,5-三磷酸肌醇受体 (1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R), 可以抑制钙调动和 NLRP3 的激活; 磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 通过介导二磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2) 的裂解, 生成 1,4,5-三磷酸肌醇 (1,4,5-trisphosphate, IP3), 进而激活 IP3R, 使内质网释放 Ca<sup>2+</sup>, 促进 NLRP3 的激活<sup>[17]</sup>。另有研究显示, 钙感受受体 (calcium-sensing receptor, CASR) 是一种 G 蛋白偶联受体, 在 PLC 的上游发挥作用, 可引起钙调动和 NLRP3 的激活, 但 CASR 和相关的家族成员 GPRC6A, 只在细胞外 Ca<sup>2+</sup> 诱导的 NLRP3 激活中发挥作用, 对 ATP 诱导的 NLRP3 的激活无影响<sup>[18]</sup>。值得注意的是, Ca<sup>2+</sup> 调动和线粒体钙超载可能引起线粒体功能紊乱, 进而促进 NLRP3 的激活, 在细胞外介质培养基中加入 Ca<sup>2+</sup>, 会引起颗粒物的形成和 K<sup>+</sup> 外流, 使这些实验结果复杂化<sup>[14]</sup>。

近来亦有研究提出, NLRP3 炎症小体的激活与  $\text{Ca}^{2+}$  信号无关; 该研究将胞浆  $\text{K}^+$  浓度的降低和胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高对 NLRP3 激活的作用进行比较发现,  $\text{Ca}^{2+}$  对 NLRP3 的激活不是必要的, 因而认为 BAPTA 阻断 NLRP3 的激活, 与它抑制  $\text{Ca}^{2+}$  信号的作用无关<sup>[19]</sup>。

综上所述, NLRP3 炎症小体的激活本就是多种细胞和分子效应综合协调的结果, 影响因素众多, 过程十分复杂, 任意一种离子浓度变化都可能影响其激活过程, 除了  $\text{K}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化对 NLRP3 的激活有影响外, 氯离子通道蛋白 CLIC1 和 CLIC4 也可能参与调节 NLRP3 炎症小体的激活。

**2.2.3 线粒体功能失调和 ROS** 目前, 线粒体和 ROS 在 NLRP3 炎症小体激活过程中的确切作用尚未明确<sup>[20-21]</sup>。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶生成的胞浆

ROS 是 NLRP3 炎症小体激活的常见信号。硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin-interacting protein, TXNIP) 是 NLRP3 的配体, 且对 ROS 敏感。在正常生理条件下, 氧化还原酶硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 与 TXNIP 结合, 并抑制其活性; 当细胞内 ROS 浓度增加时, 该复合物解离, TXNIP 与 NLRP3 (主要是 LRRs 结构域) 结合, 进而激活 NLRP3 (见图 3)。然而, 缺乏 NADPH 氧化酶活性的人外周血单核细胞和小鼠巨噬细胞中, NLRP3 炎症小体仍然能够正常激活<sup>[22]</sup>。这可能是由于 ROS 的来源除 NADPH 氧化酶外, 还有线粒体和黄嘌呤氧化酶。农药百草枯发挥细胞毒性作用, 主要是通过促进 ROS 生成, 上调 TXNIP 的表达, 诱导 NLRP3 炎症小体激活和细胞因子分泌, 进而引起细胞焦亡; 而水飞蓟素可以诱导 TRX 和抗氧化酶的表达, 抑制 TXNIP 和 NLRP3 的结合, 进而降低百草枯的细胞毒性<sup>[23]</sup>。

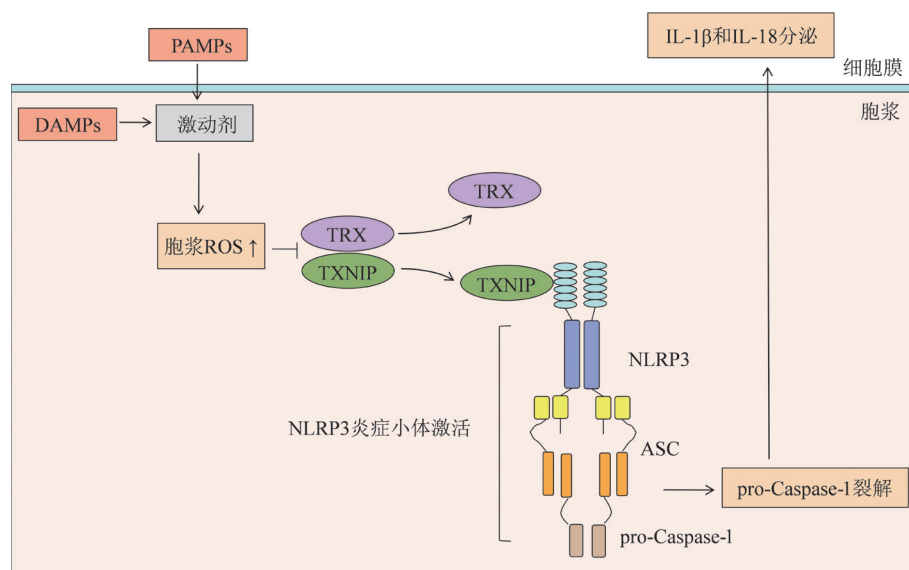


图 3 NLRP3 炎症小体的胞浆 ROS 激活模型

Figure 3 The cytoplasmic ROS model of NLRP3 inflammasome activation

早期研究发现, 线粒体的扰动能促进 NLRP3 炎症小体的激活, 推测线粒体功能紊乱与 NLRP3 激活有关<sup>[24]</sup>。定位于线粒体的保守的 NLR 家族蛋白 NLRX1, 能够促进线粒体 ROS 的生成; 同时, 释放至胞浆的氧化的线粒体 DNA 能与 NLRP3 相互作用并激活 NLRP3。双磷脂酰甘油是一种通常位于线粒体内膜的特异性磷脂, 它可以转运到外膜, 进而与 NLRP3 的 LRRs 结合, 并激活 NLRP3<sup>[25]</sup>。线粒体相关调节蛋白 [mitochondria-associated adaptor, 即线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)] 也与 NLRP3 炎症小体

的激活有关, 但具体作用机制仍存在争议<sup>[4,26]</sup>。研究表明, MAVS 能与 NLRP3 相互作用, 且在可溶性刺激物 (如 ATP、尼日利亚菌素) 诱导 NLRP3 激活时是必需的, 在颗粒物 [如单钠尿酸盐 (monosodiumurate, MSU)、明矾] 刺激时是非必需的<sup>[26]</sup>。另有研究显示, MAVS 在 RNA 病毒诱导的 NLRP3 激活中发挥作用, 在非病毒刺激 (如 ATP、尼日利亚菌素) 诱导时, 不发挥作用<sup>[4,27]</sup>。总而言之, 线粒体在 NLRP3 炎症小体激活过程中的确切作用仍不清楚。

**2.2.4 溶酶体破裂导致组织蛋白酶 B 释放** 溶酶体是

在真核细胞中分解蛋白质、核酸、多糖等生物大分子的一种细胞器, 内含蛋白酶、核酸酶、磷酸酶、脂肪酶等多种水解酶。溶酶体既能分解外界进入细胞内的物质, 也能消化内源性的大分子。组织蛋白酶 B 是木瓜蛋白酶家族的一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 颗粒物质通过内吞作用, 可破坏溶酶体膜, 使组织蛋白酶 B 释放至胞浆, 从而激活 NLRP3 炎症小体。CA-074-Me 是组织蛋白酶 B 的化学抑制剂, 该化合物能抑制 NLRP3 的激活; 然而, 对于组织蛋白酶 B 缺陷的巨噬细胞, 颗粒物质依然能够诱导 NLRP3 炎症小体的激活<sup>[28]</sup>。因此, 组织蛋白酶 B 的抑制剂对 NLRP3 炎症小体激活的抑制作用可能是因为脱靶效应或组织蛋白酶家族成员冗余。近来研究认为, 多种组织蛋白酶能够促进 NLRP3 的启动和激活, 且这些蛋白酶都能被 CA-074-Me 抑制<sup>[29]</sup>。

颗粒物质除了引起胞浆组织蛋白酶的释放, 也引起  $K^+$  外流, 此过程依赖于吞噬作用, 是 NLRP3 炎症小体激活的必需步骤; 将巨噬细胞与亲溶酶体剂二肽 L-亮氨酸-亮氨酸甲基酯共同孵育, 能引起  $K^+$  的迅速外流, 加速 NLRP3 的激活<sup>[14]</sup>。此外, 通过吞噬作用进入胞浆的颗粒物质, 在被溶酶体完全清除前, 也能引起胞浆 ROS 的上调, 经 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路, 诱导 NLRP3 炎症小体激活<sup>[30]</sup>。

综上所述,  $K^+$  外流、 $Ca^{2+}$  信号、胞浆 ROS、溶酶体破裂等分子和细胞效应相互渗透, 相互影响, 综合调节了 NLRP3 炎症小体的激活。

### 3 NLRP3 炎症小体激活的调节因子

已被报道的 NLRP3 炎症小体激活的调节因子, 包括双链 RNA 依赖的蛋白激酶 (double-stranded RNA dependent protein kinase, PKR)、鸟苷酸结合蛋白 5 (guanylate-binding protein 5, GBP5) 和 Nek7<sup>[31-33]</sup>。

#### 3.1 蛋白激酶 PKR

PKR 调节所有已知的炎症小体的激活, 包括 NLRP1、NLRP3、NLRC4 和 AIM2。有研究分别从野生型和 PKR 缺陷型的小鼠中提取巨噬细胞进行体外实验发现, 与野生型相比, PKR 缺陷型的小鼠提取的巨噬细胞中, Caspase-1 的激活、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌明显受到抑制; 用 PKR 的抑制剂 2-氨基嘌呤 (2-aminopurine, 2-AP) 处理野生型小鼠来源的巨噬细胞后, Caspase-1 的激活和 IL-1 $\beta$  的分泌降低; 因此, 该研究认为基因敲除或药理抑制 PKR 之后, 相关刺

激所引起的 Caspase-1 的激活, 以及 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟均会有所减弱<sup>[34]</sup>。然而, 也有研究认为, 给予 NLRP3 的激动剂如 ATP、尼日利亚菌素和二氧化硅时, PKR<sup>+/+</sup> 来源和 PKR<sup>-/-</sup> 来源的巨噬细胞内, Caspase-1 的活化以及 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌水平与未给予时无显著变化; 野生型来源的巨噬细胞内, Caspase-1 的活化以及 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌水平与 PKR<sup>-/-</sup> 来源的巨噬细胞相当, 因而该研究认为 PKR 对炎症小体的激活、Caspase-1 的活化、pro-IL-1 $\beta$  的裂解以及 IL-1 $\beta$  的分泌不是必需的<sup>[35]</sup>。

#### 3.2 鸟苷酸结合蛋白 GBP5

与 PKR 相似, GBP5 在 NLRP3 炎症小体激活过程中的作用也存在争议。在 GBP5 缺陷型小鼠来源的巨噬细胞中, 细菌组分如 LPS 和尼日利亚菌素诱导的 Caspase-1 的活性减弱; 而颗粒物质如 MSU 或明矾诱导的组织蛋白酶 B 正常释放, Caspase-1 的激活以及 IL-1 $\beta$  的分泌不受影响, 即在 ATP、尼日利亚菌素和细菌刺激时, GBP5 会促进 NLRP3 炎症小体的激活; 在不溶性颗粒物质刺激时, GBP5 对 NLRP3 炎症小体的激活无影响<sup>[36]</sup>。另有研究则认为, 在 GBP5 缺陷的小鼠巨噬细胞中, 经典的和非经典的炎症小体激活通路均不受影响, 即 NLRP3 炎症小体可以正常激活<sup>[37]</sup>。

#### 3.3 Nek7

与 PKR 和 GBP5 不同, 有 3 项独立的研究均认为 Nek7 在 NLRP3 炎症小体激活过程中有重要作用<sup>[31-33]</sup>。Nek7 属于 NIMA (never-in-mitosis A) 相关激酶家族, 主要参与调节有丝分裂过程和 DNA 损伤反应。研究显示, 有 Nek7 缺陷的小鼠胚胎发育晚期会死亡且生长受到阻滞, 表明 Nek7 在胚胎生长和存活过程中有着举足轻重的作用<sup>[38]</sup>。相关研究认为, 所有 NLRP3 的刺激物 (包括 ATP、尼日利亚菌素、MSU 结晶和明矾) 诱导的 NLRP3 炎症小体的激活均需要 Nek7, 而 NLRC4 和 AIM2 等炎症小体的激活不需要 Nek7<sup>[31-33]</sup>。Nek7 的催化区和 NLRP3 的 LRRs 区可相互作用, 形成 NLRP3-Nek7 大分子复合物, NLRP3 的激动剂能增强该作用, Nek7 介导的 NLRP3 的激活与其激酶活性无关<sup>[31-32]</sup>。Nek7 在  $K^+$  外流的下游可调控 NLRP3 的寡聚化、ASC 斑点的形成和 Caspase-1 的激活<sup>[31]</sup>。Nek7 对 NLRP3 激活的重要作用在体内模型中进一步得到证实: 与野生型小鼠相比, Nek7 缺陷的小鼠 IL-1 $\beta$  分泌减少, 免疫细胞的聚集减弱, 疾病严重度降低<sup>[31-32]</sup>。这些结果均表明,

Nek7 是 NLRP3 炎症小体激活的正向调节因子。当细胞外有高浓度的  $K^+$  存在时, Nek7 和 NLRP3 的相互作用被抑制, 表明此相互作用需要  $K^+$  的外流, 考虑可能是因为细胞内  $K^+$  浓度的降低引起 NLRP3 构象的改变, 从而促进 Nek7 与 NLRP3 结合; 当 NLRP3 发生不依赖于  $K^+$  外流的激活突变 (NLRP3<sup>R258W</sup>) 时, 炎症小体的激活仍然需要 Nek7<sup>[31]</sup>。因此, 探究 Nek7 对 NLRP3 激动剂的反应机制, 将会给 NLRP3 炎症小体激活的分子机制研究提供新的思路。

#### 4 NLRP3 炎症小体与疾病

在微生物感染过程中, NLRP3 炎症小体可帮助宿主免疫系统抵抗甲型流感病毒、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌等感染性的微生物, 维持机体内环境稳态。然而, NLRP3 炎症小体的异常激活也会引发某些遗传性或获得性炎症疾病, 如痛风、2 型糖尿病、动脉粥样硬化、炎症性肠病和阿尔茨海默病等<sup>[3]</sup>。

痛风是一种因尿酸盐浓度升高, 造成 MSU 结晶沉积而引起的慢性关节炎。MSU 结晶作用于宿主巨噬细胞, 可激活 NLRP3 炎症小体, 释放成熟的 IL-1 $\beta$ , 加重痛风发作<sup>[39]</sup>。2 型糖尿病是以胰岛素抵抗和胰岛 B 细胞功能失调为特征的慢性疾病, 常伴随胰岛淀粉样多肽 (islet amyloid polypeptide, IAPP) 的沉积。IAPP 刺激树突细胞和巨噬细胞, 调控 NLRP3 炎症小体激活, 诱导 pro-Caspase-1 蛋白裂解和 IL-1 $\beta$  分泌, 促进 2 型糖尿病的发生发展。动脉粥样硬化发生在大动脉内壁, 以脂质代谢障碍为病变基础, 常进展为心肌梗死或卒中<sup>[40]</sup>。低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 可激活 NF- $\kappa$ B 信号通路, 上调巨噬细胞中 pro-IL-1 $\beta$  的表达, 同时诱导 ROS 生成和溶酶体破裂, 并促进胆固醇结晶的沉积, 进一步激活 NLRP3 炎症小体。炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种因免

疫反应失调所致的反复发作的肠道慢性炎症性疾病, 包括克罗恩病和溃疡性结肠炎, 临床表现为腹痛、腹泻和直肠出血, 易进展为结直肠癌。NLRP3 参与炎症性肠病的机制比较复杂, 一方面 NLRP3 抑制肠道有害微生物的过度繁殖, 另一方面某些细菌产物可激活 NLRP3 炎症小体, 引起 IL-1 $\beta$  过度分泌, 增加炎症性肠病的易感性<sup>[41]</sup>。阿尔茨海默病是一种神经退行性疾病, 临床表现为进行性记忆减退和认知功能障碍<sup>[42]</sup>。小胶质细胞吞噬  $\beta$  淀粉样蛋白, 可引起溶酶体破裂, 激活 NLRP3 炎症小体, 生成 IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  通过诱导 tau 蛋白高度磷酸化, 影响突触可塑性, 抑制长时程增强效应和学习记忆能力, 而 NLRP3 炎症小体可进一步抑制小胶质细胞对  $\beta$  淀粉样蛋白和细胞碎片的清除能力, 从而加重阿尔茨海默病病情。

综上所述, NLRP3 炎症小体参与上述疾病的发生过程, 因而成为这些疾病的潜在治疗靶标。靶向 NLRP3 炎症小体及其下游信号分子的药物, 主要包括一线降糖药格列本脲、IL-1 受体拮抗剂阿那白滞素、IL-1 $\beta$  单克隆抗体卡纳单抗、 $\beta$ -羟基丁酸<sup>[43]</sup> 和磺酰脲类化合物 MCC950<sup>[44]</sup>, 但这些药物存在半衰期短、生物利用度差、不易透过血脑脊液屏障等缺点, 因此 NLRP3 抑制剂在相关疾病治疗中的应用仍需进一步的临床研究。

#### 5 结语

近年来, 对 NLRP3 炎症小体的研究取得了重要进步, 证实了  $K^+$  外流对 NLRP3 炎症小体激活的重要性, 但  $Ca^{2+}$  信号, 线粒体功能失调和 ROS, 以及溶酶体破裂对 NLRP3 激活的具体作用仍存在争议。进一步探究多种细胞和分子效应综合调节 NLRP3 炎症小体激活和共同维持内环境稳态的机制, 将为相关疾病的诊断和治疗提供新的方向和思路。

#### [ 参考文献 ]

- [1] Bae J Y, Lee S W, Shin Y H, *et al.* P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome activation in head and neck cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 48972-48982.
- [2] Chen G Y, Núñez G. Inflammasomes in intestinal inflammation and cancer [J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(6): 1986-1999.
- [3] Baldwin A G, Brough D, Freeman S. Inhibiting the inflammasome: a chemical perspective [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(5): 1691-1710.
- [4] Allam R, Lawlor K E, Yu E C, *et al.* Mitochondrial apoptosis is dispensable for NLRP3 inflammasome activation but non-apoptotic Caspase-8 is required for inflammasome priming [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(9): 982-990.
- [5] Gurung P, Anand P K, Malireddi R K S, *et al.* FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and non-canonical Nlrp3 inflammasomes [J]. *J Immunol*, 2014, 192(4): 1835-1846.

- [6] Schroder K, Sagulenko V, Zamoshnikova A, *et al.* Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction [J]. *Immunobiology*, 2012, 217(12): 1325-1329.
- [7] Juliana C, Fernandesalmemri T, Kang S, *et al.* Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(43): 36617-36622.
- [8] Fernandesalmemri T, Kang S, Anderson C, *et al.* Cutting edge: TLR signaling licenses IRAK1 for rapid activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Immunol*, 2013, 191(8): 3995-3999.
- [9] Lin K M, Hu W, Troutman T D, *et al.* IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(2): 775-780.
- [10] Song H, Liu B, Huai W, *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRIM31 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting proteasomal degradation of NLRP3 [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13727.
- [11] Py B F, Kim M S, Vakifahmetoglu-norberg H, *et al.* Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(2): 331-338.
- [12] Lopez-Castejon G, Luheshi N M, Compan V, *et al.* Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1 $\beta$  secretion via assembly of the inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4): 2721-2733.
- [13] Gross O, Poeck H, Bscheider M, *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence [J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 433-436.
- [14] Munozplanillo R, Kuffa P, Martinezcolon G, *et al.* K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter [J]. *Immunity*, 2013, 38(6): 1142-1153.
- [15] Pétrilli V, Papin S, Dostert C, *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(9): 1583-1589.
- [16] Chu J, Thomas L M, Watkins S C, *et al.* Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 $\beta$  from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5): 1227-1238.
- [17] Lee G S, Subramanian N, Kim A I, *et al.* The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP [J]. *Nature*, 2012, 492(7427): 123-127.
- [18] Rossol M, Pierer M, Raulien N, *et al.* Extracellular Ca<sup>2+</sup> is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors [J]. *Nat Commun*, 2011, 3: 1329.
- [19] Katsnelson M A, Rucker L G, Russo H M, *et al.* K<sup>+</sup> efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca<sup>2+</sup> signaling [J]. *J Immunol*, 2015, 194(8): 3937-3952.
- [20] Lawlor K E, Vince J E. Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(4): 1433-1440.
- [21] Elliott E I, Sutterwala F S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 35.
- [22] Van B R, Köker M Y, Jansen M, *et al.* Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent [J]. *Blood*, 2010, 115(26): 5398-5400.
- [23] Liu Z, Sun M, Wang Y, *et al.* Silymarin attenuated paraquat-induced cytotoxicity in macrophage by regulating Trx/TXNIP complex, inhibiting NLRP3 inflammasome activation and apoptosis [J]. *Toxicol in Vitro*, 2017: 265-272.
- [24] Zhou R, Yazdi A S, Menu P, *et al.* A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 221-225.
- [25] Iyer S S, He Q, Janczy J R, *et al.* Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 311-323.
- [26] Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy M R, *et al.* The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation [J]. *Cell*, 2013, 153(2): 348-361.
- [27] Ermler M E, Traylor Z, Patel K, *et al.* Rift Valley fever virus infection induces activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *Virology*, 2014, 449: 174-180.
- [28] Catherine D, Greta G, Romero J F, *et al.* Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6510.
- [29] Orłowski G M, Colbert J D, Sharma S, *et al.* Multiple cathepsins promote pro-IL-1 beta synthesis and NLRP3-mediated IL-1 beta activation [J]. *J Immunol*, 2015, 195(4): 1685-1697.
- [30] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 210-215.
- [31] He Y, Zeng M Y, Yang D, *et al.* NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux [J]. *Nature*, 2016, 530(7590): 354-357.
- [32] Shi H, Ying W, Li X, *et al.* NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(3): 250-258.
- [33] Schmidburgk J L, Chauhan D, Schmidt T, *et al.* A genome-wide CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) screen identifies NEK7 as an essential component of NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(1): 103-109.



- [34] Lu B, Nakamura T, Inouye K, *et al.* Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release [J]. *Nature*, 2012, 488(7413): 670-674.
- [35] He Y, Franchi L, Nunez G. The protein kinase PKR is critical for LPS-induced iNOS production but dispensable for inflammasome activation in macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(5): 1147-1152.
- [36] Shenoy A R, Wellington D A, Kumar P, *et al.* GBP5 promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals [J]. *Science*, 2012, 336(6080): 481-485.
- [37] Meunier E, Dick M S, Dreier R F, *et al.* Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 366-370.
- [38] Salem H, Rachmin I, Yissachar N, *et al.* Nek7 kinase targeting leads to early mortality, cytokinesis disturbance and polyploidy [J]. *Oncogene*, 2010, 29(28): 4046-4057.
- [39] Liu H J, Pan X X, Liu B Q, *et al.* Grape seed-derived procyanidins alleviate gout pain via NLRP3 inflammasome suppression [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 74.
- [40] Paramel Varghese G, Folkersen L, Strawbridge R J, *et al.* NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(5): e003031.
- [41] Lazaridis L D, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis E J, *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel disease: differences between crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(9): 2348-2356.
- [42] Olsen I, Singhrao S K. Inflammasome involvement in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 54(1): 45-53.
- [43] Youm Y H, Nguyen K Y, Grant R W, *et al.* The ketone metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 263-269.
- [44] Coll R C, Robertson A A, Chae J J, *et al.* A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248-255.

## 《药学进展》杂志征稿启事

《药学进展》杂志由中国药科大学和中国药学会共同主办、国家教育部主管,月刊,80页,全彩印刷。刊物以反映药学科领域的新方法、新成果、新进展、新趋势为宗旨,以综述、评述为特色,以药学科进展、技术进展、新药研发各环节前沿科技信息为重点,主要报道医药科研创新链、学科链、技术链、产业链的国内外研究前沿与进展,是一本专注于医药科技前沿、创新药物研发、医药产业前沿的专业媒体。

《药学进展》编委会由国家重大专项化学药总师陈凯先院士担任主编,编委由新药研发技术链政府监管部门、高校科研院所、制药企业、临床医院、CRO、金融资本及知识产权相关机构百余位极具影响力的专家组成。

《药学进展》注重内容策划,加强组稿约稿,以各类专题突出栏目特色。为拓宽报道广度,增加报道深度,“专家论坛”栏目细分领域和药学科,已连续组稿策划“肿瘤药理学研究进展”、“聚焦心脑血管疾病药物”、“糖尿病药物研发策略”、“靶向纳米递药系统的创新药物制剂设计”、“化学探针在药学领域中的应用”等十几个重点专题,并邀请知名专家对每一专题进行评述。同时,本刊还不定期刊登“生物制药论坛”、“新技术新方法”和“医药知识产权”等专栏,逐步形成系统、全面、前瞻的期刊特色。现以国家自然科学基金、国家重点研发计划的部分选题为报道重点,就以下专题广泛征稿:

- 药物新靶点作用机制及相关药物研发
- 精准药物设计
- 重大疾病的传统药物的药物基因组学与个体化精准用药研究
- 伴随新药临床试验的药物基因组学与个体化精准用药研究
- 精神神经类疾病个体化治疗靶标发现
- 心血管药理学研究进展
- 免疫系统药物研发
- 多学科交叉领域

欢迎来稿!

投稿系统: <http://www.cpupps.cn> 联系电话: 025-83271227