

NLRP3 炎症小体与动脉粥样硬化的研究进展

陈海燕 谭春燕 胡厚祥

【摘要】 炎症小体是模式识别受体家族的一种多聚体蛋白复合物,作为分子平台来激活半胱天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1),从而调节促炎性细胞因子的释放。研究表明,NLRP3 在动脉粥样硬化的发生、发展中起重要作用。该文就 NLRP3 炎症小体活化、调控机制及动脉粥样硬化中的相关研究进展作一综述。

【关键词】 NLRP3;动脉粥样硬化;炎症小体

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.05.010

人类固有免疫系统通过模式识别受体(pattern-recognition receptor, PRR)识别外源性病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)和内源性损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)。PRR 包括 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)、RIG-I 样受体(RIG-I-like receptor, RLR)和 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLR)。NLR 是近年发现的一类固有免疫模式受体,在病原识别、免疫调节和启动炎症反应中发挥重要作用。部分 NLR 分子可协同其他蛋白在细胞质中形成一类多蛋白复合物,称为炎症小体,介导 caspase-1 的活化和炎症因子的成熟,如白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的成熟。NLR 家族由 3 个亚家族组成:NOD 亚家族(NOD1~5、CIITA)、NLRP 亚家族(NLRP1~14)和 IPAF 亚家族(IPAF 和 NAIP)。其中,NLRP3 是 NLRP 亚家族的典型成员,NLRP3 炎症小体也是目前研究最深入的一种炎症小体。NLRP3 炎症小体的激活与多种疾病的发病机理密切相关,如动脉粥样硬化、心肌缺血-再灌注损伤、心肌病、阿尔茨海默病、痛风、代谢综合征等^[1]。NLRP3 激活后可使无活性的 caspase-1 前体(pro-caspase-1)裂解为有活性的 caspase-1,活化的 caspase-1 将 IL-1 β 前体(pro-IL-1 β)和 IL-18 前体(pro-IL-18)裂解为成熟体 IL-1 β 和 IL-18,从而引起无菌性炎症反应和 caspase-1 依赖的细胞死亡,即细胞焦亡^[2]。

1 NLRP3 炎症小体的活化

NLRP3 炎症小体由支架蛋白 NLRP3、连接蛋白凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)和效应蛋白 pro-caspase-1 组成。NLRP3 由 3 个结构域组成:羧基端的亮氨酸富集结构域(LRR)、中心核苷酸域(NACHT)及氨基端热蛋白结构域(PYD)。ASC 包含氨基端 PYD 及羧基端 caspase 募集域(CARD)。caspase-1 包含 CARD 和 caspase 域。

常见的 NLRP3 炎症小体活化机制包括:钾离子(K⁺)外流,溶酶体溶解及线粒体活性氧(ROS)的产生^[3]。LRR 识别配体,促使炎症小体复合体组装,进一步活化 NLRP3。NLRP3 活化后,PYD 与 ASC 相互作用,ASC 的 CARD 募集并结合 pro-caspase-1,这些相互作用促成了 NLRP3 炎症小体的装配,最终致使 pro-caspase-1 发生剪切和活化。活化的 caspase-1 将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 加工成其生物学活性的成熟形式,释放 IL-1 β 和 IL-18。

2 NLRP3 炎症小体活化的调控

活化的炎症小体诱导 caspase-1 依赖的细胞焦亡,在动脉粥样硬化中发挥作用^[4]。炎症小体的活化调控包括多个层面。在分子和细胞水平,磷酸化、泛素化、亚硝基化及微管依赖的线粒体空间排列起着重要作用。炎症小体还与许多其他细胞因子的信号通路相关联。Qiao 等^[5]用 TLR 激动剂脂多糖和肽聚糖刺激小鼠腹膜巨噬细胞,发现细胞内 NLRP3 的 mRNA 和蛋白表达均明显升高,表明在小鼠巨噬细胞中 NLRP3 的表达受 TLR 的调控。Mishra 等^[6]研究发现,在结核分枝杆菌感染的小鼠

基金项目:国家自然科学基金项目(81070101),四川省教育厅课题(12ZA060)

作者单位:637000 四川省,川北医学院附属医院心内科

通信作者:胡厚祥,Email:hhxiang17@163.com

中, γ 干扰素能特异性抑制 NLRP3 炎症小体活化, 减少 IL-1 β 的释放。Jefferies 等^[7]研究发现, 三重基序蛋白(tripartite motif containing protein, TRIM) 家族成员可调控炎症小体复合体的组装和 IL-1 β 的释放。PYD 特有蛋白(Pyrin-only protein) 和 CARD 特有蛋白(CARD-only protein) 通过对 PYD 和 CARD 结构域的竞争性抑制发挥调控作用。多个研究表明自噬可调节炎症小体的活化^[8-10]。自噬功能的降低导致对 NLRP3 炎症小体活化的抑制作用缺失, 可加剧 NLRP3 炎症小体的活化。另外, 自噬也能清除细胞内过多的炎症小体复合物, 修复和重组受损蛋白。

3 NLRP3 炎症小体与动脉粥样硬化

炎症在动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥重要作用。C 反应蛋白(CRP) 是炎症的生物学标志, 全基因组关联研究认为, NLRP3 基因定位于调控血浆 CRP 水平的区域。

3.1 动脉粥样硬化中炎症小体的触发

NLRP3 多在免疫细胞中表达, 尤其是巨噬细胞。cDNA 数据库分析表明, 心血管组织并不组成性、持续表达炎症小体相关分子。在心血管组织中, 功能性炎症小体的组装依赖于炎症小体复合物中一些关键组分的表达上调^[11]。

在动脉粥样硬化发展的过程中, 胆固醇是炎症小体通路的重要激活剂, 在疾病早期就发挥重要作用。Duewell 等^[12]发现, 载脂蛋白 E(ApoE) 缺失的小鼠高脂饮食 2 周, 就能形成胆固醇结晶, 进一步用胆固醇结晶刺激人外周血单核细胞或注射入小鼠发现, 胆固醇结晶可通过激活 NLRP3 炎症小体释放大量的 IL-1 β , 促进动脉粥样硬化的形成。

低密度脂蛋白的氧化修饰是动脉粥样硬化形成早期的重要阶段。体外研究显示, 巨噬细胞通过 CD36 受体吞噬氧化低密度脂蛋白, 导致巨噬溶酶体内胆固醇结晶的形成, 损伤溶酶体, 从而活化 NLRP3 炎症小体^[13-14]。

动脉粥样硬化与一些可激活炎症小体的内生性应激分子相关。体外研究发现, β 淀粉样蛋白可触发 NLRP3 的活化。对动脉粥样硬化患者的研究发现, 损伤的动脉壁内含有淀粉样蛋白, 但动脉粥样硬化中淀粉样蛋白沉积与炎症小体活化之间的关系还有待证实。在动脉粥样硬化发展过程中, 泡沫细胞内的胆固醇沉积可诱导内质网应激, 内质网应激可导致未折叠蛋白和折叠错误蛋白的积累, 进

一步活化炎症小体, 引起炎症病变。

心血管疾病的危险因素包括高血糖、高尿酸血症、肥胖、牙周炎等, 这些危险因素被证实具有独立调控炎症小体活化的能力, 并可调节胆固醇结晶依赖通路的激活。Zhou 等^[15]研究发现, 高血糖可诱导与胰岛素抵抗相关的硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP) 表达, TXNIP 参与 NLRP3 炎症小体的活化, 增加尿酸盐晶体依赖的炎症小体的激活。肥胖与脂肪组织的炎症反应及 NLRP3 炎症小体的活化相关。随着脂肪的积累超过脂肪细胞的容纳量, 过多的脂肪侵入其他组织中, 除了三酰甘油和脂肪酸, 这些组织中的神经酰胺也越来越多。肥胖相关的神经酰胺通过触发脂肪组织中的巨噬细胞, 激活 NLRP3 炎症小体及释放 IL-1 β 。高尿酸血症出现在动脉粥样硬化斑块形成之前, 被认为是心血管疾病病死率的独立危险因素之一。随着尿酸的不断积累, 尿酸盐结晶形成, 尿酸盐结晶可激活 NLRP3 炎症小体, 导致 IL-1 β 释放, 这可能与高尿酸血症在动脉粥样硬化形成过程中发挥的作用有关。病原菌也是一种重要的炎症小体激活剂。近年来研究发现, 牙周疾病可通过下调人类单核巨噬细胞中 ASC 的表达, 来分解 NLRP3 炎症小体复合体^[16]。牙周炎被认为是动脉粥样硬化的危险因素之一, 这可能与它对炎症小体的调节有关。

3.2 炎症小体的活化促进动脉粥样硬化的发展

IL-1 β 和 IL-18 在促进炎症反应发生、发展中发挥重要作用, 而 IL-1 β 和 IL-18 的成熟则依赖于 NLRP3 炎症小体的激活。研究表明, IL-1 β 和 IL-18 是动脉粥样硬化形成的主要因素。Kirii 等^[17]对 ApoE 基因敲除(ApoE^{-/-}) 小鼠的研究发现, IL-1 β 水平降低使动脉粥样硬化的病变范围减小 30%。在 ApoE^{-/-} 小鼠中过表达 IL-1 受体的天然拮抗蛋白 IL-1ra, 可减轻动脉粥样硬化病变程度; ApoE^{-/-} IL-1ra^{+/-} 小鼠动脉粥样硬化病变范围较 ApoE^{-/-} IL-1ra^{+/+} 小鼠增大; ApoE^{-/-} IL-1ra^{-/-} 小鼠则显示出严重的主动脉炎症反应^[18]。人体动脉粥样硬化斑块, 尤其是斑块巨噬细胞中高表达 IL-18, 并且 IL-18 水平升高与动脉粥样硬化斑块的不稳定性相关。

动脉粥样硬化斑块中 caspase-1 的活化标志着炎症小体的活化。研究发现, 冠心病患者血浆中 caspase-1 水平是心血管源性死亡的预测因素之一。Usui 等^[19]对 caspase-1 敲除的 ApoE^{-/-} 小鼠

(ApoE^{-/-} caspase-1^{-/-}) 的研究发现,小鼠动脉粥样硬化病变范围缩小,血浆 IL-1 β 及病变相关的 γ 干扰素水平均明显降低。

有许多研究探讨 NLRP3 炎症小体与动脉粥样硬化之间的直接关系,但得出的结论不尽相同。Duewell 等^[12]用高脂饮食喂养低密度脂蛋白受体敲除(LDLR^{-/-})小鼠,构建动脉粥样硬化模型,发现骨髓细胞 NLRP3、ASC 或 IL-1 α/β 敲除可使动脉粥样硬化程度明显减轻。然而,Menu 等^[20]却发现,在同时敲除 ApoE 和 NLRP3 炎症小体组分的双敲除模型中,如同时敲除 ApoE 和 NLRP3 (ApoE^{-/-} NLRP3^{-/-})、ApoE 和 ASC (ApoE^{-/-} ASC^{-/-}) 或 ApoE 和 caspase-1 (ApoE^{-/-} caspase 1^{-/-}),给予高脂饮食后,NLRP3 炎症小体组分敲除并未使动脉粥样硬化形成、巨噬细胞浸润及斑块稳定性出现明显变化。对上述报道的差异可做如下解释。首先,在动脉粥样硬化病变的不同阶段,炎症小体具有不同作用。以上两组实验中动脉粥样硬化病变程度差异较大,高脂饮食喂养 ApoE 敲除模型的动脉粥样硬化病变较 LDLR 敲除模型更为严重和晚期,说明炎症小体主要在动脉粥样硬化的病变早期发挥作用。其次,两个实验所使用的动物模型也不同。上述 LDLR 敲除模型中,NLRP3 炎症小体缺失是通过骨髓细胞 NLRP3、ASC 和 caspae-1 特异性敲除实现的,而 ApoE 敲除模型则是复合 NLRP3 炎症小体组分的全身性敲除。像其他各种全身敲除模型一样,NLRP3 炎症小体组分的全身性敲除则可能导致理论上的补偿反应。最后,ApoE 缺乏本身可引起独立于炎症小体的炎性反应,并可能掩盖炎症小体活化的致炎作用。然而,也有研究发现 ApoE、caspase-1 双敲除对动脉粥样硬化形成有明显的保护作用^[21],这与上述 Menu 等^[20]的研究结果不一致。Zheng 等^[22]通过向 ApoE^{-/-} 小鼠注射慢病毒,沉默 NLRP3 的表达,发现 NLRP3 基因沉默防止了动脉粥样斑块的进展,降低了斑块内炎症因子水平和巨噬细胞数量,并增加了斑块内平滑肌细胞数量和胶原的含量,促进粥样斑块的稳定。近期研究进一步揭示了 NLRP3 炎症小体活化在动脉粥样硬化形成中的作用。Xiao 等^[23]发现,血流震荡可通过固醇调节元件蛋白 2 (SREBP2) 激活血管内皮细胞 NLRP3 炎症小体,并在合并高血脂的条件下加重了小鼠主动脉的动脉粥样硬化病变。Peng 等^[24]发现,氧化

低密度脂蛋白(oxLDL)通过激活 NLRP3 炎症小体,促进了动脉粥样硬化的发展,并且 NLRP3 炎症小体活化由嘌呤受体 2X7R (purinergic 2X7 receptor, P2X7R) 介导。

4 展望

NLRP3 炎症小体触发的炎性反应在动脉粥样硬化形成中起重要作用,这预示着 NLRP3 和 IL-1 β 可能是动脉粥样硬化治疗的潜在靶点。目前,抗 IL-1 β 药物主要有阿那白滞素(anakinra)、IL-1ra、利纳西普(rilonacept)、IL-1 诱捕剂、康纳单抗(canakinumab)、人类抗 IL-1 β 单克隆抗体。然而,目前尚无针对 NLRP3 的药物。明确 NLRP3 在动脉粥样硬化中的作用,有利于更好地理解无菌性炎症的机制,开发特异性抑制剂。

参 考 文 献

- [1] Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives[J]. J Inflamm Res, 2015, 8: 15-27.
- [2] Wree A, Eguchi A, McGeough MD, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2014, 59(3): 898-910.
- [3] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13 (6): 397-411.
- [4] Chang W, Lin J, Dong J, et al. Pyroptosis: an inflammatory cell death implicates in atherosclerosis[J]. Med Hypotheses, 2013, 81(3): 484-486.
- [5] Qiao Y, Wang P, Qi J, et al. TLR-induced NF-kappaB activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages[J]. FEBS Lett, 2012, 586(7): 1022-1026.
- [6] Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1beta[J]. Nat Immunol, 2013, 14(1): 52-60.
- [7] Jefferies C, Wynne C, Higgs R. Antiviral TRIMs: friend or foe in autoimmune and autoinflammatory disease? [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(9): 617-625.
- [8] Shi CS, Shenderov K, Huang NN, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction[J]. Nat Immunol, 2012, 13(3): 255-263.
- [9] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13 (10): 722-737.
- [10] Harris J. Autophagy and IL-1 family cytokines[J]. Front Immunol, 2013, 4: 83.

(下转第 334 页)

- sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in cardiac myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(4): 480-486.
- [13] Li PC, Yang YC, Hwang GY, et al. Inhibition of reverse-mode sodium-calcium exchanger activity and apoptosis by levosimendan in human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes after anoxia and reoxygenation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e85909.
- [14] Soliman D, Wang L, Hamming KS, et al. Late sodium current inhibition alone with ranolazine is sufficient to reduce ischemia-and cardiac glycoside-induced calcium overload and contractile dysfunction mediated by reverse-mode sodium/calcium exchange [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 343(2): 325-332.
- [15] Xu KY, Zhu W, Chen L, et al. Mechanistic distinction between activation and inhibition of $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ -mediated Ca^{2+} influx in cardiomyocyte [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(2): 200-203.
- [16] Guo HC, Guo F, Zhang LN, et al. Enhancement of Na^+/K^+ pump activity by chronic intermittent hypobaric hypoxia protected against reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(6): H2280-H2287.
- [17] Wang HG, Chu YF, Zou JG, et al. Antidigoxin antiserum prevents endogenous digitalis-like compound-mediated reperfusion injury via modulating sodium pump isoform gene expression [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(1): 38-44.
- (收稿: 2015-04-01 修回: 2015-08-12)
(本文编辑: 梁英超)
-
- (上接第 331 页)
- [11] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases[J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 296-307.
- [12] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. *Nature*, 2010, 464 (7293): 1357-1361.
- [13] 于 佳, 倪唤春, 罗心平. 脂质代谢相关基因多态性与动脉粥样硬化[J]. *国际心血管病杂志*, 2014, 41(3): 173-175.
- [14] Ding Z, Liu S, Wang X, et al. LOX-1, mtDNA damage, and NLRP3 inflammasome activation in macrophages; implications in atherogenesis[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(4): 619-628.
- [15] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136-140.
- [16] Zhao P, Liu J, Pan C, et al. NLRP3 inflammasome is required for apoptosis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-infected human osteoblastic MG63 cells[J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(7): 1119-1124.
- [17] Kirii H, Niwa T, Yamada Y, et al. Seishima M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(4): 656-660.
- [18] Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, et al. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3): 583-593.
- [19] Usui F, Shirasuna K, Kimura H, et al. Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 162-168.
- [20] Menu P, Pellegrin M, Aubert JF, et al. Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e137.
- [21] Staal J, Bekaert T, Beyaert R. Regulation of NF-kappaB signaling by caspases and MALT1 paracaspase [J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 40-54.
- [22] Zheng F, Xing S, Gong Z, et al. Silence of NLRP3 Suppresses Atherosclerosis and Stabilizes Plaques in Apolipoprotein E-Deficient Mice [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 507208.
- [23] Xiao H, Lu M, Lin TY, et al. Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility [J]. *Circulation*, 2013, 128(6): 632-642.
- [24] Peng K, Liu L, Wei D, et al. P2X7R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(5): 1179-1188.
- (收稿: 2015-02-02 修回: 2015-08-10)
(本文编辑: 梁英超)