

· 综 述 ·

NOD 样受体蛋白 3 炎性小体在创伤性脊髓损伤中的作用

吴鑫杰, 谭明生, 移平

(中日友好医院, 北京 100029)

摘 要 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体是介导固有免疫反应的重要蛋白, 在创伤性脊髓损伤的第 2 个病理阶段中发挥着重要作用。炎性小体的活化被认为是半胱氨酸蛋白酶-1 依赖的焦亡途径的一个关键因素, 参与半胱氨酸蛋白酶-1 的活化并将白细胞介素 18 和白细胞介素 1 β 前体转化为活性形式, 导致脊髓神经细胞死亡。本文对 NLRP3 炎性小体的结构及 NLRP3 炎性小体在创伤性脊髓损伤中的作用机制、激活途径及其调节以及 NLRP3 炎性小体在创伤性脊髓损伤治疗中的作用进行了综述。

关键词 脊髓损伤; NLRP3; 焦亡; 综述

脊髓损伤是脊髓组织受到直接或间接暴力后, 以其功能障碍或缺失为主要改变的中枢神经系统疾病。以损伤平面以下感觉、运动及反射功能障碍或缺失为主要特点。脊髓损伤的病理过程可分为 2 个阶段: 第 1 个阶段为原发性损伤, 发生在损伤即刻, 以损伤部位神经细胞及神经纤维机械性损伤, 脊髓出血、水肿, 局部缺血性坏死、结构破坏为主^[1]; 第 2 个阶段为继发性损伤, 在损伤后一段时间发生, 以弥漫性炎症反应以及神经细胞、神经胶质细胞的凋亡等为主要表现, 甚至向高位脊髓扩展^[2]。

固有免疫系统是机体防御体系的第 1 道防线, 在脊髓损伤后可募集大量的中性粒细胞和吞噬细胞浸润损伤部位, 在清除坏死组织的同时也会进一步加重神经细胞的损伤^[3]。Martinon 等^[4]于 2002 年首次发现并描述了炎性小体, 发现其与多种自身炎症疾病相关。脊髓损伤后的病理刺激可激活胞内受体, 进而导致炎性小体的组装、活化并介导损伤后的炎症反应, 进一步加重神经组织的损伤。因此, 炎性小体在诱导脊髓损伤后的炎症反应中扮演了重要角色。现就 NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体在创伤性脊髓损伤中的作用的进展进行综述。

1 NLRP3 炎性小体的结构

NLRP3 炎性小体也称为 NALP3 或 Cryopyrin, 是细胞质中的多蛋白复合物, 由 NLRP3 受体蛋白、含有

CARD 的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和效应分子前半胱氨酸蛋白酶-1(pro-cysteiny aspartate specific proteinase-1, Pro-caspase-1) 三部分构成^[5]。相关研究显示, 在大鼠脊髓损伤模型中, NLRP3 主要表达于神经细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞中, 但以神经细胞为主^[3]。

NLRP3 是 NLRs 家族成员之一, 是炎性小体组成的核心成分, 包含 3 个结构域: 其 C 端为富含亮氨酸重复结构域, 主要功能是识别病原相关分子模式或危险相关分子模式、且在自我调节及蛋白质相互作用中起到重要作用^[6]; 中央为核苷酸结合寡聚化结构域, 可与核苷酸结合, 通过激活蛋白寡聚化来形成炎性小体。Fann 等^[7]的究发现, NLRP3 炎性小体的寡聚化不仅可减少炎性复合体的形成, 而且可以减少半胱氨酸蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase-1) 的激活及白细胞介素(interleukin, IL)-18、IL-1 β 的成熟, 从而降低脊髓损伤后的炎症反应; N 端为热蛋白结构域(pyrin domain, PYD), 具有将 NLRP3 和衔接蛋白、效应分子连接起来的功能(图 1)。在缺乏激活信号的情况下, NLRP3 炎性小体与胞质中的 SGT1 和热休克蛋白 90 相复合而表现为抑制状态, 但其在脊髓损伤中的相关调控机制尚未完全明确^[8]。

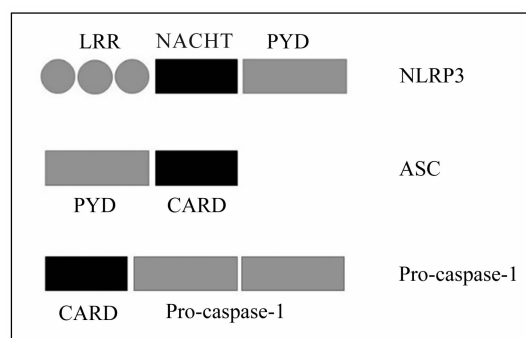
ASC 是由 195 个氨基酸残基组成的衔接蛋白, 包含 2 个结构域: N 端为效应结构域, 与 NLRP3 N 端的 PYD 相连接; C 端为 Caspase-1 募集结构域, 功能是招募与连接 Pro-caspase-1(图 1)。但也有相关研究显示, 在炎性小体的活化过程中 ASC 不是必需的,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81873141); 北京市科委首都临床特色应用研究专项课题(Z161100000516009)

通讯作者: 移平 E-mail: dryiping_123@163.com

但能够起到增强其活化的作用^[9]。

Caspase-1 通常以无活性的 Pro-caspase-1 形式存在,最早是在研究细胞凋亡的过程中被发现的^[10]。包含 1 个 CARD 和 1 个 Pro-caspase-1 结构域,一旦被激活,能够裂解 IL-1 β 、IL-18 等细胞因子的前体,使其转化为成熟的 IL-1 β 、IL-18,同时 Caspase-1 还可介导质膜上的孔道开放,使促炎因子分泌到细胞外,这种依赖于 Caspase-1 且伴有明显炎症的细胞死亡方式称为经典途径细胞焦亡^[2]。



LRR:富含亮氨酸重复结构域;NACHT:核苷酸结合寡聚化结构域;PYD:热蛋白结构域;ASC:凋亡相关斑点样蛋白;Pro-caspase-1:前半胱氨酸蛋白酶-1

图1 NOD样受体蛋白3炎症小体的结构

2 NLRP3 炎症小体在创伤性脊髓损伤中的作用机制

NLRP3 炎症小体的形成和活化与其他炎症小体不同,它可被广泛的危险信号活化,目前已知的有尿酸盐晶体、胆固醇晶体、石棉、细胞外三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)等^[5]。提示 NLRP3 可能作为一种细胞内通用的危险或应激感受器来识别细胞内外异常信号,其活化通常分为 2 个阶段。

首先,脊髓损伤后大量危险相关分子模式或病原相关分子模式释放,被模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)所识别,进一步激活创伤后神经炎症反应。活化信号通过 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)/NF- κ B 信号途径增加炎症小体的转录并触发转录后修饰,这一信号通常由 TLR 介导,而该受体是 PRRs 家族成员之一,主要表达于星形胶质细胞、小胶质细胞和巨噬细胞^[7]。TLR 可以诱导 NF- κ B 的活化,通过结合 NLRP3 启动子中的 NF- κ B 相关位点,参与 NLRP3 转录的调控^[11]。相关研究也证明,在外周免疫细胞中, NF- κ B 信号途径可调节 NLRP3 炎症小体、IL-18 前体及 IL-1 β 前体的蛋白表

达^[7]。Ni 等^[12]研究发现,脊髓损伤后 72 h, TLR4 mRNA 和蛋白质表达增加,且与 NF- κ B DNA 的结合活性也有所增加。TLR 信号途径可分为髓样分化因子 88 和 TRIF 依赖的信号途径。髓样分化因子 88 信号途径主要介导 NF- κ B 的激活,但其对脊髓损伤中 NLRP3 炎症小体的调控机制尚不明确^[13]。

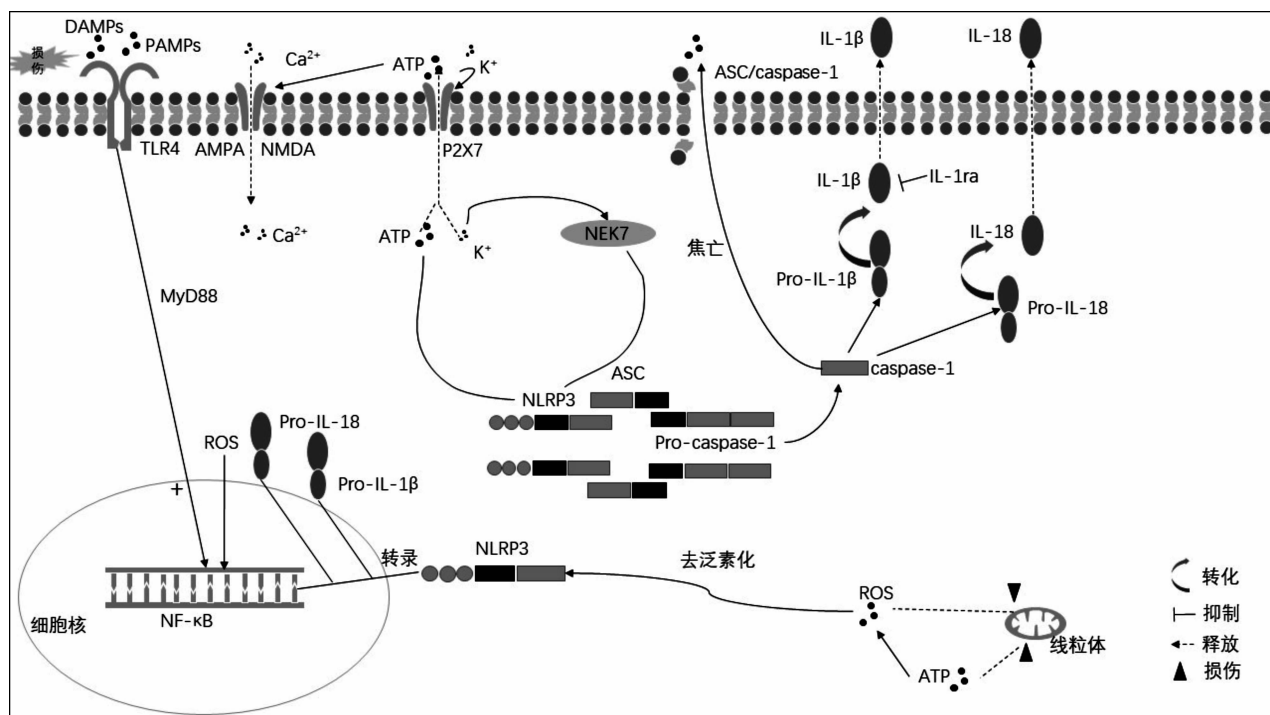
第 2 个阶段主要涉及炎症小体的组装、活化及 IL 的加工。Wallisch 等^[6]研究发现, NLRP3 炎症小体与急慢性中枢神经系统损伤间存在密切关系, ≤ 4 岁的患者脑脊液中 NLRP3 的水平高于 >4 岁的患者,且 NLRP3 水平高于 $6.63 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 者预后较差。NLRP3 在脊髓损伤后第 1、4、5 天达到高值,早期升高可能是由于坏死性细胞死亡或创伤性裂解,而 NLRP3 水平的升高可能代表感染、应激及其他炎症小体的激活。Liu 等^[14]发现在中枢神经系统损伤后, NLRP3 的组装具有时间依赖性,损伤后 6 h、24 h 及 7 d, NLRP3 mRNA 水平急剧上升。Simon 等^[15]采用 NLRP3 中和抗体后,发现小鼠 IL-1 β 的加工明显减少,有效降低了脊髓损伤。此外, NLRP3 还可被小分子 MCC950、生酮饮食、格列本脲及米诺环素所抑制。

IL-1 β 、IL-18 具有相似的三维结构,均可引发和(或)促进辅助 T 细胞 1 相关的固有免疫反应。原发性脊髓损伤后 IL-1 β 、IL-18 水平的过表达可以引起血脑屏障的破坏及神经毒性分子的产生,导致继发性细胞死亡。De Rivero Vaccari 等^[1]发现,中段颈髓挫伤可引发 Caspase-1 的激活及 IL-1 β 、IL-18 的加工,并发现 Caspase-1 和 Caspase-11 的招募对于炎症小体的形成极为重要,表明 2 种 Caspase 均参与到了 IL 的加工中。

3 NLRP3 炎症小体在创伤性脊髓损伤中的激活途径及其调节

由于 NLRP3 受体识别物质的多样性,表明激活物质可能存在共同的内源性信号传导分子,但这一观点尚存争议。目前研究认为内源性危险信号,如 K^+ 、ATP、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、溶酶体释放的内容物等,均可通过激活 NLRP3 受体来触发 NLRP3 炎症小体的组装、活化,并导致 Caspase-1 和 IL-1 β 的成熟与释放(图 2)。

脊髓损伤后质膜上孔道开放、内源性电子通道形成均可使细胞内 K^+ 浓度降低而激活 NLRP3 受体。



DAMPs: 损伤相关分子模式; PAMPs: 病原体相关分子模式; TLR: Toll 样受体; AMPA: α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸; NMDA: N-甲基-D-天冬氨酸; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; Caspase-1: 半胱氨酸蛋白酶-1; IL: 白细胞介素; MyD88: 髓样分化因子 88; ATP: 三磷酸腺苷; Nek7: NIMA 相关激酶 7; ROS: 活性氧; Pro-caspase-1: 前半胱氨酸蛋白酶-1

图 2 脊髓损伤后 NOD 样受体蛋白 3 激活示意图

相关研究表明,采用药物阻断细胞内 K^+ 外流或将细胞置于高浓度 K^+ 的细胞培养液中时,几乎所有已知的激活物都无法再激活 NLRP3 炎性小体^[16-17]。He 等^[18]发现 NIMA 相关激酶(NIMA-related kinase, Nek)可能是 K^+ 外流的下游效应物,在缺少 Nek7 的脊髓损伤模型中,NLRP3 激活物无法激活 Caspase 以及 IL-1 β 的释放,认为其可能在 NLRP3 炎性小体的寡聚化和活化中起作用,但仍需进一步研究。

细胞外 ATP 与 ATP-阳离子通道 P2X7 结合,在细胞膜上形成膜孔均可导致 K^+ 和 ATP 外流,细胞外高水平的 ATP 可引起高频电位,通过使君子酸和 N-甲基-D-门冬氨酸受体导致细胞内 Ca^{2+} 增加,进而导致细胞死亡。Petrilli 等^[19]研究发现,当细胞内 K^+ 浓度低于 $143 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,可有效激活 NLRP3 炎性小体。将脊髓神经细胞置于高浓度的 ATP 溶液中,可引发高频电位、钙内流以及神经细胞死亡。Murakami 等^[20]研究发现,耗尽内质网中 Ca^{2+} 储存或阻止细胞外 Ca^{2+} 内流均可抑制 ATP 诱导的 NLRP3 的激活;抑制 Ca^{2+} 信号转导的关键介质磷脂酶 C,可减少 IL-1 β 的分泌, Ca^{2+} 信号的释放能够促进线粒体的损伤,

进而激活 NLRP3。

NLRP3 受体还可能被胞质中局部增高的 ROS 活化^[21]。相关研究显示,ATP 可以诱导 ROS 的产生,通过应用 ROS 清除剂,如褪黑素等封锁 ROS 的产生,可抑制多种激活物,阻止 NLRP3 的表达上调。这可能是通过抑制 NF- κ B 介导的 NLRP3 炎性小体上调,提示其可作为新的分子靶点^[22]。目前 ROS 活化 NLRP3 受体的机制尚不清楚,可能与硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)有关^[23]。随着胞质内 ROS 的增加,硫氧还蛋白-TXNIP 复合体分离,导致 TXNIP 与 NLRP3 受体结合并引起其活化。Gustin 等^[24]认为 ATP 可通过线粒体产生过量 ROS,导致 NLRP3 去泛素化,进一步促进其活化。但目前有关 TXNIP 及 ROS 激活 NLRP3 的作用尚未形成共识。Dostert 等^[25]通过 ATP 刺激野生型及 TXNIP 缺陷型小鼠,未发现 NLRP3 炎性小体的活化水平有明显改变。

溶酶体内存在多种蛋白水解酶,主要包括组织蛋白酶家族,其破坏后释放的组织蛋白酶 B 与多种中枢神经系统疾病相关。组织蛋白酶 B 释放入胞浆,可引

起 NLRP3 炎性小体的激活,导致脊髓损伤炎症反应。此外,P2X7 受体激活也可引起溶酶体内容物的释放。组织蛋白酶 B 抑制剂可明显减少 IL-1 β 的释放^[26]。

4 NLRP3 炎性小体在创伤性脊髓损伤治疗中的作用

NLRP3 炎性小体是炎性反应中的重要介质,靶向阻断其信号传导通路的上游和下游也许能为脊髓损伤的治疗提供新的途径,这些靶向目标包括炎性小体组分、质膜受体或离子通道、第二信使、涉及其信号传导的细胞因子及其受体,尤其是他们的表达、组装、活化和分泌。目前研究发现抗 ASC 抗体、雌激素、基质细胞衍生因子-1 α 、高压氧治疗、法舒地尔、A-68930 及槲皮素均可通过不同作用方式减少炎性小体的组装及活化,但其临床疗效仍有待进一步研究^[2-3,27]。笔者认为需进一步研究细胞内外 K⁺ 平衡及其对 NLRP3 激活作用的影响,明确脊髓损伤后不同阶段炎性小体亚型的作用、相关细胞的特异性表达等。

5 展 望

NLRP3 炎性小体在创伤性脊髓损伤炎症反应中具有重要作用,但具体机制在很多方面仍需进一步探索,包括其调控的具体途径以及与其他信号通路之间的相关性。对炎性小体的进一步深入研究有望为脊髓损伤的治疗提供新的思路和靶点。

6 参考文献

- [1] DE RIVERO VACCARI J P, LOTOCKI G, MARCILLO A E, et al. A molecular platform in neurons regulates inflammation after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(13):3404-3414.
- [2] LIN W P, XIONG G P, LIN Q, et al. Heme oxygenase-1 promotes neuron survival through down-regulation of neuronal NLRP1 expression after spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):52.
- [3] ZENDEDEL A, MOENNINK F, HASSANZADEH G A, et al. Estrogen attenuates local inflammasome expression and activation after spinal cord injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2):1364-1375.
- [4] MARTINON F, BURNS K, TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2):417-426.
- [5] FLESHNER M, FRANK M, MAIER S F. Danger signals and inflammasomes: Stress - Evoked sterile inflammation in mood disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1):36-45.
- [6] WALLISCH J S, SIMON D W, BAYIR H, et al. Cerebrospinal fluid NLRP3 is increased after severe traumatic brain injury in infants and children [J]. *Neurocrit Care*, 2017, 27(1):44-50.
- [7] FANN D Y, LIM Y A, CHENG Y L, et al. Evidence that NF- κ B and mapk signaling promotes nlrp inflammasome activation in neurons following ischemic stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2):1082-1096.
- [8] MARTINON F. Detection of immune danger signals by NALP3 [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3):507-511.
- [9] FAUSTIN B, LARTIGUE L, BRUEY J M, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(5):713-724.
- [10] MIAO E A, LEAF I A, TREUTING P M, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(12):1194-1196.
- [11] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5):373-384.
- [12] NI H B, JIN W, ZHU T S, et al. Curcumin modulates TLR4/NF- κ B inflammatory signaling pathway following traumatic spinal cord injury in rats [J]. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 2015, 38(2):199-206.
- [13] KONG F, YE B, CAO J, et al. Curcumin represses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF- κ B and P2X7R signaling in PMA-induced macrophages [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7:369.
- [14] LIU H D, LI W, CHEN Z R, et al. Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(10):2072-2083.
- [15] SIMON D W, MCGEACHY M J, BAYIR H, et al. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(3):171-191.
- [16] KATSNELSON M A, RUCKER L G, RUSSO H M. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling [J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194(8):3937.
- [17] GAO L, DONG Q, SONG Z, et al. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke [J]. *Inflamm Res*, 2017,

- 66(1):17-24.
- [18] HE Y, ZENG M Y, YANG D H, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of Potassium efflux[J]. Nature, 2016, 530(7590):354.
- [19] PETRILLI 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.
- [20] MURAKAMI T, OCKINGER J, YU J, et al. Critical role for Calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(28): 11282-11287.
- [21] NAKAHIRA K, HASPEL J A, RATHINAM V A, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome[J]. Nat Immunol, 2011, 12(3): 222-230.
- [22] MORTEZAEI K, KHANLARKHANI N, SABBAGHZIARIANI F A, et al. Preconditioning with melatonin improves therapeutic outcomes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in targeting liver fibrosis induced by CCl4[J]. Cell Tissue Res, 2017, 369(2):303-312.
- [23] LANE T, FLAM B, LOCKEY R, et al. TXNIP shuttling: missing Link between oxidative stress and inflammasome activation[J]. Front Physiol, 2013, 4:50.
- [24] GUSTIN A, KIRCHMEYER M, KONCINA E, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(6):e130624.
- [25] DOSTERT C, PÉTRILLI V, VAN BRUGGEN R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica[J]. Science, 2008, 320(5876): 674-677.
- [26] HALLE A, HORNUNG V, PETZOLD G C, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta[J]. Nat Immunol, 2008, 9(8): 857-865.
- [27] ZENDEDEL A, JOHANN S, MEHRABI S, et al. Activation and regulation of NLRP3 inflammasome by intrathecal application of SDF-1a in a spinal cord injury model[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(5):3063-3075.
- (收稿日期:2019-01-22 本文编辑:李晓乐)

· 简 讯 ·

《中医正骨》2019 年广告业务范围及收费标准

■ 医疗、科研、教学单位及药械生产营销企业介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的器械设备介绍

■ 用于骨伤科医疗、科研、教学的中西药物及中间体介绍

■ 各种形式的骨伤科讯息,如书刊征订、招生启事、会议通知等

刊登位置	印刷规格	版面	每期收费标准(元)	半年收费标准(元)	全年收费标准(元)
封二	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	9 000	54 000	75 600
封三	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	8 000	48 000	67 200
封底	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	10 000	60 000	84 000
前插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	7 000	42 000	58 800
后插页	大 16 开彩色铜版纸印刷	全版	6 000	36 000	50 400
内文图文	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120
内文文字	大 16 开黑白铜版纸印刷	全版	3 000	18 000	25 200
	大 16 开黑白铜版纸印刷	1/2 版	1 800	10 800	15 120