·综述·

炎性小体的研究进展

孟庆才 朱鏐娈 马雅鎏

炎性小体是由多种蛋白质组成的复合体,分子量约 700 kD,此概念由 Tschopp 研究小组于 2002 年首次提出[1]。炎性小体能够调节胱冬肽酶-1(caspase-1)的活化进而在天然免疫防御的过程中促进细胞因子前体 pro-IL-1β 和 pro-IL-18 的切割成熟[2];还能调节 caspase-1 依赖的形式编程性细胞死亡(pyroptosis)[3],诱导细胞在炎性和应激的病理条件下死亡。目前已发现的炎性小体主要有 4 种,即 NLRP1、NLRP3、IPAF 和 AIM2 炎性小体。已发现的炎性小体一般均含有凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD,ASC)、caspase 蛋白酶及一种 NOD 样受体(NOD-like receptor,NLR)家族蛋白(如 NLRP1)或 HIN200 家族蛋白(如 AIM2)。炎性小体活性异常与人类的多种遗传疾病或后天疾病发生相关,如遗传性周期发热综合征等[4]。

一、NOD 样受体(NLR)家族

NOD 样受体(NOD-like receptor,NLR)是在天然免疫中识别细胞内细菌等病原体感染的一类模式识别受体(pattern recognition receptor,PRR)。不同的 NLR 能够识别胞浆中不同病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular pattern,PAMP)或识别内源性分子进而激活下游的caspase-1,caspase-1 可以通过剪切的方式活化 pro-IL-1β 和 pro-IL-18,从而使大量成熟的 IL-1β 和 IL-18 得以释放[5]。IL-1β 由单核-巨噬细胞、粒细胞和肝细胞等多种细胞所释放,是介导炎性感染的重要细胞因子之一。有活性的 IL-1β 是一种内生致热源,其在炎性应答中有多种功能,如激活淋巴细胞和表皮细胞等。IL-18 主要表达于树突细胞、星形细胞、角质细胞和软骨细胞中,最初发现其功能是诱导 IFN-γ 的产生。NLR 家族目前已发现 23 种人源蛋白及 34 种鼠源蛋白。NLR 由 3 部分结构组成,即 C-末端的亮氨酸重复序列(LRR)、中心区的 NACHT 结构域和 N-末端的 caspase 募集结构域(CARD)或 pyrin 结构域(PYD)[6]。

LRR(leucine-rich repeats)结构域为含有 20 ~ 30 个氨基酸残基的模体,组成 β 折叠-α 螺旋的重复结构单元,且所有的 β 折叠平行于同一轴线形成一个马蹄形的分子。Toll 样受体(Toll-like receptors,TLR)中 LRR 结构域可识别并结合相应配体,包括 LPS、脂蛋白、鞭毛和病毒 RNA 等病原相关的分子模式;虽然 NOD 样受体(NLR)的 LRR 结构域也能感知多种类型的激活物,但这些激活物是否可与其直接结合至今未明确,提示 NLR 对病原体或其他信号的感知可能是间接的[7]。

NACHT 结构域位于 NLR 的中心位置,其结构近似于凋亡介导蛋白 APAF1 的 NB-ARC 结构域,APAF1 通过激活 caspase-9 来诱发凋亡小体组装活化,NB-ARC 结构域在结合细胞色素 C 之后诱导 ATP 依赖的 APAF1 聚合作用,从而诱导细胞凋亡[7];同样,NLR 激活的重要步骤也依赖于 NACHT 结构域的多聚体化,进而形成有功能的高分子量复合体,即炎性小体。

根据 N-末端效应结构域的种类,有学者将 NLR 家族分为 NOD、IPAF 和 NLRP 3 个亚家族[6]。大多数 NLR 的N-末端含有一种死亡折叠结构域(death-fold domain,DFD),即 CARD 或 PYD。死亡折叠结构域最初发现于促凋亡的通路中,主要有 CARD、PYD、死亡结构域(death domain,DD)及死亡效应结构域(death effector domain,DED)[8],以上 4 种结构域常发现于活化的 caspase 或 NF-κB 信号转导通路中。研究发现,所有含有死亡折叠结构域的家族成员会与另一个含有同样结构域的蛋白相互作用,从而为凋亡和免疫相关的信号转导通路的确定提供有力的推理依据。另外,死亡折叠结构域是受体与衔接蛋白和效应蛋白结合的纽带[8]。

NLR 家族在体内具有多种生理功能(表 1),其中部分 NLR 成员参与炎性小体的组装和活化,愈加受到国内外科研工作者的重视。

二、炎性小体的种类

1. NLRP1 炎性小体:NLRP1 炎性小体是首个被确定的炎性小体,由 NLRP1、caspase-1、caspase-5 和衔接蛋白 ASC、CARDINAL 组成[1]。NLRP1 在结构上不同于其他类型的 NLRP,除含有 PYD、NACHT 和 LRR 结构域外,C-末端还有未知功能的扩展域,即 F Ⅱ ND 和 CARD 结构域,其他类型的 NLRP 均无 C-末端的扩展域。小鼠 Nlrp1 蛋白缺少 N-末端 PYD 结构域,提示 NLRP1 在人和小鼠体内可能发挥不同的作用[7]。NLRP1 是首个发现的与炎性小体组装相关的 NLR 家族成员,其被确定为诱发 caspase-1 活化的高分子蛋白复合物(700 kD)的中心组件。最初的"炎性小体"指 NARP1 复合体,随着研究的深入才逐渐扩展了这一概念。细菌肽聚糖衍生物胞壁酰二肽(muramyl dipeptide,MDP)能够激活 NLRP1 炎性小体的组装[9]。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.04.021

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No.81101446)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(孟庆才、朱鏐娈);中国中医科学院中医基础理论研究所(马雅鎏)

通讯作者:马雅鎏,Email:yaluanma@yahoo.com

表 1 NLR 家族的主要成员

NLR	信号通路	功能	相关疾病
CIITA	MHC Ⅱ转录因子	调节 MHC Ⅱ类分子基因的表达	淋巴细胞减少症,风湿性关节炎,多发性硬化
NAIP	活化 JNK 通路	识别鞭毛	军团菌易感性(小鼠),棘肌萎缩症
NOD1	活化 NF-κB 和 MAPK 通路	诱导细胞凋亡和自噬	炎性肠病,哮喘
NOD2	活化 NF-κB 和 MAPK 通路	减弱 TLR2 应答诱导细胞自噬	早发伯克肉瘤,移植物抗宿主病
NLRC3	–	参与 T 细胞的负调节	–
NLRC4	炎性小体的形成	识别鞭毛,诱导形式编程性细胞死亡	–
NLRC5	Ⅰ型干扰素的应答,MHC Ⅰ的调节	调节天然免疫,影响 MHC Ⅰ提呈	–
NLRP1	炎性小体的形成	被 MDP 和危险相关的分子模式(DAMPs)激活	白癜风,Ⅰ型糖尿病
NLRP2	炎性小体的形成	NF-κB 负调控因子	Beckwith-Widemann 综合征, 移植物抗宿主病
NLRP3	炎性小体的形成	应答危险相关的分子模式(DAMPs)	Cryopyrin-相关周期性发热综合征(CAPS),Ⅱ型糖尿病
NLRP4	–	NF-κB 负调控因子	–
NLRP5	–	母体效应基因	雌性不育(小鼠)
NLRP6	–	NF-κB 和 IL-1β 负调控因子	–
NLRP7	–	IL-1β 负调控因子	家族性葡萄胎
NLRP8	–	–	–
NLRP9	–	–	–
NLRP10	活化 caspase-1	caspase-1 活性负调节蛋白	–
NLRP11	–	–	–
NLRP12	–	NF-κB 负调控因子	遗传性周期发热
NLRP13	–	–	–
NLRP14	–	参与精子发生	精子发生障碍
NLRX1	线粒体定位	诱导 ROS 识别病毒	–
Apaf-1	凋亡小体形成	诱导凋亡	–

注:“–”表示目前尚未知

2. IPAF 炎性小体:IPAF(也称 NLRC4 或 CARD12)炎性小体由 IPAF、ASC、caspase-1 和 NAIP5 组成的。IPAF 能够识别沙门菌的鞭毛进而活化caspase-1[10]。NAIP5 能够识别军团菌鞭毛,其与 IPAF 能够识别结构相似的鞭毛。NAIP5 需要 IPAF 存在才能激活 caspase-1,但 IPAF 则可单独激活 caspase-1。IPAF 炎性小体的组装是否需要 ASC 衔接蛋白至今仍有争议,其原因是 IPAF 自身包含能够直接募集caspase-1 的结构域 CARD,同时,IPAF 炎性小体能够被无鞭毛的细菌激活[11],提示 IPAF 炎性小体还存在其他的活化配体,但具体机理仍尚未明确。有研究发现结核分枝杆菌能够抑制 IPAF 炎性小体的活化[12]。IPAF 缺陷的巨噬细胞在沙门菌、军团菌、弗氏志贺菌和铜绿色假单胞菌等革兰阴性菌感染后,其激活 caspase-1 和释放 IL-1β 的能力明显下降[13]。

3. NLRP3 炎性小体:NLRP3 炎性小体是迄今为止结构和功能最为明确的炎性小体,主要由 NLRP3(也称 cryopyrin 或 NALP3),ASC 和 caspase-1 组成。病毒、真菌和细菌等多种病原体及其 PAMPs 均能刺激 NLRP3 炎性小体的组装、活化[14];MDP 和细菌成孔毒素也能诱导 NLRP3 炎性小体的组装;胞外 ATP[15]、单钠尿酸[16]、β-淀粉样蛋白[17]和多种环境损伤[18]同样能引起 NLRP3 的活化。但是,至今无明确证据证明这些配体能直接结合 NLRP3 炎性小体,NLRP3 炎性小体的激活因素种类较多,提示对 NLRP3 炎性小体的活化是间接的。

其他类型的 NLR 家族炎性小体至今尚未发现,近年研究显示,NLRP12 能够与 ASC 在体外相互作用,与其他 NLR 家族成员组装成炎性小体的过程相似,但是尚无直接证据证实 NLRP12 能够在体内活化 caspase-1。

4. AIM2 炎性小体:新近发现的炎性小体,与含有 NLR 家族成员的其他 3 种炎性小体不同,其含有 HIN200 家族的 AIM2 蛋白[19]。AIM2 炎性小体由 AIM2、ASC 和 caspase-1 组成[6]。近年研究发现,AIM2 能够与胞浆中游离双链 DNA 分子结合而诱导 IFN-β 产生[19]。与其他 NLR 家族蛋白相似的是,AIM2 蛋白通过 PYD 结构域与衔接蛋白 ASC 结合,进而募集活化 caspase-1;不同的是, AIM2 的 HIN200 结构域已被证实能够直接结合其配体,即胞浆中的双链 DNA。无论是病毒、细菌和宿主的双链 DNA 均可以与 AIM2 发生反应,进而

调节 caspase-1 活化和 IL-1β 产生[19]。

三、NLRP3 炎性小体的活化

基于对间接活化 NLRP3 炎性小体的上游信号的研究,有学者提出了以下几种炎性小体的活化模式。第 1 种模式通过 ATP 门控的 P2X7 受体(P2X7R)[13],形成 ATP 控制的细胞膜钾离子通道。同时 P2X7R 也与另外一种通道蛋白 pannexin-1 相偶联,胞外 ATP 通过与 P2X7R 的结合也可以使 pannexin-1 的孔道开放,从而使 MDP 自细胞内囊泡进入到胞浆中来诱导 NLRP3 炎性小体的活化[20]。第二种模式不依赖 pannexin-1 蛋白,由 P2X7R 所形成的孔道使 K^+ 外流从而激活 NLRP3 炎性小体。已证实胞内 K^+ 浓度的改变与 NLRP1 炎性小体的活化有关[21],但是 K^+ 浓度改变是否引起 IPAF 炎性小体活化仍存在争议。第三种活化模式与晶体或颗粒状配体有关。石棉[22]、硅[22]、尿酸钠[23]、铝[24]和聚苯烯颗粒[25]均能够激活 NLRP3 炎性小体。石棉和硅的激活作用与活性氧(ROS)的产生有关,是由于这些颗粒对于吞噬细胞来说太过巨大而无法被完全吞噬,继而引发 ROS 大量产生[18]。有研究证实,向细胞中加入 ROS 抑制剂乙酰半胱氨酸(NAC)后,细胞内 caspase-1 活化水平明显降低[22]。然而,也有研究者认为石棉和硅等物质能够被吞噬细胞成功吞噬,并提出第四种模式:即这些晶体物质被吞噬后会导致溶酶体膜损坏破裂进而激活炎性小体,这种模式依赖吞噬小体的酸化作用和组织蛋白酶 B 的释放[23]。与此同时,有研究证实,无菌状态下单独溶酶体的破裂即可引起 NLRP3 炎性小体的活化[23],提示 NLPR3 炎性小体可能将溶酶体膜的破裂视为机体的内源性危险信号,即通常所说的危险相关的分子模式[7]。

虽然目前对炎性小体的活化机制较为清楚,但机体抑制炎性小体活化的机制尚不明确,最近研究发现效应性 T 细胞和记忆性 T 细胞能够抑制 NLRP1 和 NLRP3 炎性小体的活化[25]。

四、炎性小体与细胞因子活化

炎性小体组装活化之后最直接的作用是利用 caspase-1 的酶活性水解活化 IL-1β 和 IL-18。IL-1β 和 IL-18 炎性因子与天然免疫防御的起始、加强等方面有重要作用。IL-1β 在炎症引起的发热方面发挥着重要的生物学功能[26],其为机体对抗病原入侵、炎症、免疫反应和组织损伤的重要中间物质,在体内和体外均可诱导二级细胞因子产生,如 IL-6、CSF 和趋化因子等。IL-18 是研究发现的第一种内毒素诱导因子,能够诱导 IFN-γ 在脾脏中产生,还具有诱导其他促炎性细胞因子和增强 NK 细胞黏附分子活性等功能[27]。

五、炎性小体与形式编程性细胞死亡

形式编程性细胞死亡(pyroptosis)是 caspase-1 依赖性的一种细胞死亡方式,在某些条件下与炎性小体密切相关[28]。与凋亡过程中细胞"静静地"死亡不同,形式编程性细胞死亡是一种发生胞内感染的高炎性形式的细胞死亡。在单核-巨噬细胞系中的研究发现,NLRP1、IPAF、NLRP3 和 AIM2 炎性小体均能引发形式编程性细胞死亡。Caspase-1 的活化和 IL-18 的产生对机体清除细菌感染具有重要的作用,但是形式编程性细胞死亡能够加重炎性反应,这种病理过程见于家族性地中海发热和 Muckle-Wells 综合征[29]。Caspase-1 基因敲除小鼠对多种疾病模型具有保护作用,而该现象无法通过 IL-1β 和 IL-18 的减少来解释,提示形式编程性细胞死亡对于疾病的发病机制可能具有重要作用。探讨形式编程性细胞死亡在宿主防御和疾病发生过程中的作用以及其机制,有助于发现新的治疗靶点。

六、炎性小体与人类疾病相关性研究进展

炎性小体在人类疾病中的作用愈加明确。最初发现炎性小体与疾病相关是基于 NLRP3 基因在自身免疫病(周期性发热综合征)中的突变检测。有研究发现 IL-1β 表达失调也可诱发相应的疾病[29]。进一步研究证实,炎性小体与晶体诱导的关节炎相关。以上结果均提示对 IL-1β 的靶向治疗能够缓解由尿酸晶体引起的痛风和关节炎等疾病。已证实 NLPR1 基因突变与黑色素细胞功能异常所导致的白癜风有关,白癜风患者对类风湿性关节炎、糖尿病和系统性红斑狼疮的易感性增加,这些疾病都可能与 NLRP1 炎性小体相关[31]。另外,AIM2 炎性小体与系统性红斑狼疮、慢性关节炎的发病相关[32],还能诱导形式编程性细胞死亡从而抑制肿瘤细胞生长。AIM2 炎性小体很可能成为治疗慢性炎症疾病的新靶点。

七、展望

尽管 NLR 家族和炎性小体的研究已取得很多可喜的进展,但目前仍有诸多问题尚未明确,如大多数 NLR 家族成员的功能,是否存在活化炎性小体的直接配体,是否存在其他类型的炎性小体,吞噬小体破裂和 ROS 产生的机理,炎性小体的调节机制以及针对炎性小体下游引起炎症通路的治疗药物研发等都是未来几年内亟待解决的问题。

参 考 文 献

1 Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell,2002,10(2):417-426.

2 Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature,2006,442(7098):39-44.

3 Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. Nat Rev Immunol,2008,8(5):372-379.

4 Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, et al. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. Annu Rev Immunol,2009,27:621-668.

5 FranchiL, Warner N, Viani K, et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. Immunol Rev,2009,227(1):106-128.

6 Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell,2010,140(6):821-832.

7 Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Annu Rev Immunol,2009,27:229-265.

8 Park HH, Lo YC, Lin SC, et al. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. Annu Rev Immunol,2007,25:561-586.

9 Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. Mol Cell,2007,25(5):713-724.

10 Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, et al. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. Semin Immunopathol,2007,29(3):275-288.

11 Suzuki T, Franchi L, Toma C, et al. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. PLoS Pathog, 2007, 3 (8): 1082-1091.

12 Master SS, Rampini SK, Davis AS, et al. Mycobacterium tuberculosis prevents inflammasome activation. Cell Host Microbe, 2008, 3(4): 224-232.

13 Miao EA, Ernst RK, Dors M, et al. Pseudomonas aeruginosa activates caspase 1 through Ipaf. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (7): 2562-2567.

14 Jin Y, Birlea SA, Fain PR, et al. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. J Invest Dermatol, 2007, 127(11): 2558-2562.

15 Kahlenberg JM, Lundberg KC, Kertesy SB, et al. Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF kappa B-driven protein synthesis. J Immunol, 2005, 175(11): 7611-7622.

16 Shi Y, Evans JE, Rock KL, et al. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. Nature, 2003, 425(6957): 516-521.

17 Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol, 2008, 9(8): 857-865.

18 Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. Science, 2008, 320(5876): 674-677.

19 Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature, 2009, 458(7237): 514-518.

20 Marina-García N, Franchi L, Kim YG, et al. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. J Immunol, 2008, 180(6): 4050-4057.

21 Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, et al. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. Proc. Natl Acad Sci USA, 2008, 105(22): 7803-7808.

22 Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature, 2006, 440 (7081): 237-241.

23 Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activatethe NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol, 2008, 9(8): 847-856.

24 Sharp FA, Ruane D, Claass B, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. Proc. Natl Acad Sci USA, 2009, 106(3): 870-875.

25 Guarda G, Dostert C, Staehli F, et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. Nature, 2009, 460(7252): 269-273.

26 Fantuzzi. Lessons from interleukin-deficient mice: the interleukin-1 system. Acta Physiol Scand, 2001, 173(1): 5-9.

27 Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. J Leukoc Biol, 2003, 73(2): 213-224.

28 Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT, et al. NLRs at the intersection of cell death and immunity. Nat Rev Immunol, 2008, 8 (5): 372-379.

29 Agostini L, Martinon F, Burns K, et al. NALP3 forms an IL-1 beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. Immunity, 2004, 20(3): 319-325.

30 Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, et al. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. Nat Genet, 2001, 29(3): 301-305.

31 Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. N Engl J Med, 2007, 356(12): 1216-1225.

32 Kawane K, Ohtani M, Miwa K, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. Nature, 2006, 443(7114): 998-1002.

(收稿日期:2011-09-22)

(本文编辑:孙荣华)

孟庆才,朱缪娈,马雅鎏. 炎性小体的研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(4):347-350.