

NLRP3 炎性小体在类风湿关节炎中的研究进展

施剑峰 沈 波

摘 要 炎性小体(inflammasome)是细胞内的一类蛋白复合体,调控 IL-1 β 和 IL-18 的产生,在机体的固有免疫和适应性免疫中发挥重要作用。其中核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(nucleotide-binding oligomerization domain like receptor family, pyrin domain-containing 3, NLRP3)炎性小体是目前研究最为广泛和深入的一种炎性小体。近年发现 NLRP3 炎性小体的异常激活及调控在类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)中发挥重要作用,加强对 NLRP3 炎性小体的研究有望为 RA 的诊断、治疗及病情监控提供更多的理论依据。

关键词 NLRP3 炎性小体 类风湿关节炎 IL-1 β IL-18

中图分类号 R593.22 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.004

炎性小体(inflammasome)是位于细胞内由多种蛋白质组成的一类蛋白复合体。作为固有免疫的重要组成部分,炎性小体通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别病原微生物及内源性的危险信号,继而招募并激活 caspase-1,后者剪切 IL-1 β 和 IL-18 前体(pro-IL-1 β 和 pro-IL-18),产生相应成熟的细胞因子。类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性关节滑膜炎为特征的系统性自身免疫性疾病,炎症持续存在可引起关节软骨和骨组织的破坏,最终导致关节畸形及功能丧失,但病因尚未明确。最近研究发现,炎性小体的失调在类风湿关节炎的发生、发展中起着重要作用,其中 NLRP3 炎性小体能够识别多种病原体及信号分子,是目前被研究得最多的炎性小体,本文将从 NLRP3 炎性小体的组成、激活模式及与 RA 的相关性做一综述。

一、NLRP3 炎性小体简述

1. NLRP3 炎性小体的组成及结构:炎性小体是调控 IL-1 β 和 IL-18 产生的一类大分子复合物,最早由 Steimle V 等研究人员在 1993 年提出。炎性小体主要分为 NLRP 和 AIM2 两大类,目前被报道的炎性小体至少有 8 种。其中,被研究得最多的是 NLRP3 炎性小体,它由识别分子 NLRP3、凋亡相关点状蛋白(apoptosis associated speck-like protein containing a

CARD domain, ASC)和胱天蛋白酶 1 前体(pro-caspase-1)组成。NLRP3 属于 NOD 样受体(NOD-like receptor, NLR)家族,由羧基端的亮氨酸重复序列(leucine-rich-repeat domain, LRR),中间的核苷酸寡聚化结构域(nucleoside triphosphatase domain, NACTH)和氨基端的热休克蛋白结构域(pyrin domain, PYD)3 个部分组成。LRR 的作用是识别病原微生物及内源性信号, NACTH 则是介导 NLR 寡聚化。ASC 由 PYD 和招募并激活胱天蛋白酶的結構域(caspase activation and recruitment domain, CARD)构成, PYD 与 NLRP3 的 PYD 相互作用, CARD 则招募 pro-caspase-1。聚集的 pro-caspase-1 能其自我剪切为成熟的 caspase-1,继而剪切 IL-1 β 和 IL-18 前体,产生相应的具有活性的细胞因子,最终引起一系列的炎症反应及细胞的焦亡(pyroptosis)。

2. NLRP3 炎性小体的激活机制:静息状态下的细胞只有微量的 NLRP3,还不足以激活炎性小体。但 NLRP3 能被多种外源性或内源性的刺激物所激活,如病原微生物中的细菌、真菌、病毒和寄生虫,环境中的紫外线、二氧化硅和石棉等,以及体内代谢产生的三磷酸腺苷(ATP)、尿酸盐晶体、 β 淀粉样蛋白等也能激活 NLRP3 炎性小体^[1]。但具体的激活机制尚未明确,现已知的主要有 3 种:(1)钾离子(K⁺)外流:细胞损伤或者死亡释放的 ATP 通过激活 P2X7 嘌呤受体(ATP 控制的离子通道)引起 K⁺ 外流,提供激活 NLRP3 炎性小体所需的低 K⁺ 环境,同时该环境能促进 ASC 的聚集。此外,激活的 P2X7 招募半通道泛连接蛋白-1(pannexin-1)聚

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2016KYB328);浙江省科技厅公益技术应用研究计划项目(2016C33234)

作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院检验科

通讯作者:沈波,硕士生导师,电子信箱:shenbkz@aliyun.com

集并使其在细胞膜上的孔道开放,使胞外相应的刺激物进入胞内激活 NLRP3 炎性小体。(2)活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成:现在认为所有已知的 NLRP3 炎性小体的激动剂都能导致 ROS 产生,后者能促使硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)从硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)上释放出来,继而激活 NLRP3。(3)溶酶体的破坏及蛋白酶释放:被细胞吞噬的某些晶体或者颗粒物质,如二氧化硅、明矾和 β 淀粉样沉淀等会破坏溶酶体膜的结构,并引起溶酶体内的组织蛋白酶释放到胞质中,从而激活 NLRP3 炎性小体。其过程中,组织蛋白酶 B (cathepsin B) 的释放发挥着重要作用^[2]。

二、NLRP3 炎性小体与类风湿关节炎

RA 作为最常见的系统性自身免疫性疾病之一,其发病机制尚未阐明,但目前发现随着免疫系统的紊乱,滑膜组织中出现大量的固有免疫细胞(如单核细胞、树突状细胞和肥大细胞等)和适应性免疫细胞(如 Th1、Th17、B 细胞和浆细胞等)以及他们分泌的炎性因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-17 等),引起滑膜组织的炎性增生,继而引起软骨组织的降解及骨组织的破坏。最近研究表明,RA 的发生、发展与 NLRP3 的异常活化密切相关。

1. IL-1 β 、IL-18 与 RA:IL-1 β 和 IL-18 都是 NLRP3 炎性小体的下游效应分子,同属于白介素-1 家族成员,均为重要的促炎因子,目前发现它们可由单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、内皮细胞和成纤维样滑膜细胞等分泌而来。在 RA 疾病的进展中,IL-1 β 是一个典型的炎性因子,能诱导内皮细胞表达黏附分子、基质细胞释放趋化因子,从而招募炎性细胞到炎症部位。IL-1 β 还能诱导各种酶的产生,如磷脂酶 A2、环加氧酶 2 和 NO 合成酶,继而使炎性介质前列腺素 E₂ 和 NO 释放出来,进一步加强局部或系统系的炎性反应。Acosta-Rodriguez 等^[3, 4]发现 IL-1 β 是诱导 Th17 细胞分化及 IL-17 分泌所必需的因子。IL-17 是 RA 中另一种促炎因子,诱导炎性细胞释放炎性因子和促进滑膜细胞释放基质金属蛋白酶,对关节造成损害。此外,在体内体外实验中都证明 IL-1 β 是骨吸收的强烈刺激剂。IL-1 β 能促进核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)的产生。RANKL 是破骨细胞分化的关键因子,属于 TNF 配体家族,表达于破骨细胞、骨髓间充质干细胞、激活的 T 细胞、

RA 中的成纤维样滑膜细胞和内皮细胞。RANKL 与破骨细胞前体细胞上的 RANK 结合,促进破骨细胞激活。IL-1 β 还能抑制 RANKL 的抑制剂骨保护素(osteoprotegerin, OPG),进一步促进破骨细胞的分化。研究人员发现 IL-1 β 还能通过增加巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)来增加破骨细胞的活性^[5]。此外,IL-1 β 还能通过刺激成纤维样滑膜细胞和软骨细胞分泌基质金属蛋白酶、组织蛋白酶和肥大细胞蛋白酶直接引起关节软骨的降解。这是导致 RA 炎性反应以及关节畸形的重要原因之一。在不同的关节炎动物模型中也证实了,抑制 IL-1 β 能显著降低炎症的反应、关节软骨的降解及骨吸收^[6]。

IL-18 亦是 RA 中一个重要的炎性因子,在 RA 患者的血清、滑膜组织及滑膜液中都较正常人明显增高,而且 IL-18 与 RA 的急性相蛋白 C 反应蛋白(c reactive protein, CRP)和疾病活动度 DAS 具有正相关性。Komai-Koma 等发现 IL-18 是 RA 患者滑膜组织中 CD4⁺T 细胞的诱导物,并能促进 RA 患者外周血和滑膜液中的中性粒细胞、单核细胞的迁移和激活。Gracie 等研究人员在实验中发现 IL-18 能直接结合到淋巴细胞、巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞上的 IL-18 受体发挥刺激作用。其中成纤维样滑膜细胞作出的反应是 IL-18 参与 RA 发生、发展的关键。在体外实验中观察到,成纤维样滑膜细胞在 IL-18 的作用下能增加黏附分子、炎性因子、单核细胞趋化蛋白 1、巨噬细胞炎性蛋白 3 和血管内皮生长因子等表达,而这些都是参与 RA 进展的重要分子。此外,IL-18 还能和 IL-12 协同作用于 T 细胞,使之分泌干扰素- γ ,后者能刺激滑膜组织中的巨噬细胞分泌导致关节炎症的肿瘤坏死因子- α 和引起软骨破坏的 IL-1 β 。

2. NLRP3 炎性小体与 RA:随着对 IL-1 β 和 IL-18 的不断研究,不少研究者开始关注它们的上游分子 NLRP3 炎性小体在 RA 中的作用。Christianna 等研究人员对处于活动期的 RA 患者进行分析,发现这些患者血清中的外周单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)在 NLRP3、ASC、caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达上同 IL-1 β 和 IL-18 一样,都较正常人明显增高,其血清中的 PBMC 在 NLRP3 炎性小体刺激物作用下也较正常人分泌更多的 IL-1 β ^[7]。NLRP3 和 CARD8 上存在多个基因变异位点及多态性位点,而研究人员发现 RA 的疾病活动度

(DAS28 评分)只与 CARD8 上的 rs2043211 位点变异具有相关性^[8]。Simard 等研究人员发现 S100A8 和 S100A9 蛋白在 RA 中发挥的致炎作用与它们激活了 NLRP3 炎性小体有着密切关系^[9]。痛风是由尿酸钠沉积导致的代谢性疾病,尿酸钠在人单核细胞和小鼠巨噬细胞中能引起 IL-1 β 的释放,而此过程依赖 NLRP3 炎性小体。在 RA 中也有一定量的尿酸钠,研究人员发现与 RA 活动度相关的急性相蛋白血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 能显著促进尿酸钠对成纤维样滑膜细胞的作用,此过程也引起 NLRP3 炎性小体的过表达^[10]。这可能是引起 RA 炎症的另一重要的途径。但是,也有研究人员认为 NLRP3 炎性小体在 RA 患者的关节中只在滑膜组织的内皮细胞、B 细胞和中性粒细胞中表达相关 mRNA 和蛋白,而成纤维样滑膜细胞只表达 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 的 mRNA,而相关的蛋白并不会表达^[11]。也有研究人员发现 RA 患者血清中 NLRP3 炎性小体和 NLRP1 的 mRNA 表达水平较正常人低,认为 NLRP3 同 NLRP1 都是对 RA 发挥保护作用^[12]。

在 RA 动物模型上的研究,NLRP3 炎性小体对 RA 的作用也颇有争议。Zhang 等^[13]认为,NLRP3 在胶原诱导型关节炎(collagen induced arthritis, CIA)动物模型中发挥重要的作用。Ding 等^[14]研究者也证明了仙茅苷是通过抑制 NLRP3 炎性小体而发挥对 CIA 小鼠的缓解作用。但 Ippagunta 等^[15]发现在关节炎的发生率和严重程度方面, CIA NLRP3^{-/-} 和 caspase-1^{-/-} 小鼠与 CIA 野生型小鼠相比并没有差异。在 Kolly 等^[16]的研究中发现抗原诱导的关节炎小鼠(antigen induced arthritis, AIA)也与 NLRP3 炎性小体不具有相关性。最近, Vande 等^[17]研究者对小鼠髓巨噬细胞的 TNFAIP3 基因进行了敲出,发现小鼠的 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 都显著增高,并且表现出 RA 样的症状。提示我们适合研究 NLRP3 炎性小体的 RA 动物模型尚处于起步阶段,而非炎症小体 NLRP3 与 RA 的发生、发展并无关系。

虽然 IL-1 β 和 IL-18 在 RA 中的致炎和损伤软骨及骨组织的作用已经被肯定,但其上游调控分子 NLRP3 炎性小体在 RA 中的作用极具争议性。近年来,NLRP3 炎性小体作为研究的热点,其组成及结构已基本明确,但其激活通路及调控机制并未明确。尤其在 RA 中,对 NLRP3 炎性小体的研究尚处于起步

阶段,随着的深入研究,有望为 RA 的诊断、治疗及病情监控提供更多的理论依据。

参考文献

- 1 Yang CS, Shin DM, Jo EK. The role of NLR-related protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases [J]. *Int Neurol J*, 2012, 16(1):2-12
- 2 Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, *et al*. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(8):847-856
- 3 Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, *et al*. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(9):942-949
- 4 Hot A, Miossec P. Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synovocytes [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(5):727-732
- 5 Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system [J]. *Endo Rev*, 2008, 29(4):403-440
- 6 Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, *et al*. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNF α , anti-IL-1 α / β and IL-1Ra [J]. *Arth Rheum*, 2008, 58(2 Suppl):S110-S122
- 7 Choulaki C, Papadaki G, Repa A, *et al*. Enhanced activity of NLRP3 inflammasome in peripheral blood cells of patients with active rheumatoid arthritis [J]. *Arth Res Ther*, 2015, 17:257
- 8 Ben Hamad M, Cornelis F, Marzouk S, *et al*. Association study of CARD8 (p. C10X) and NLRP3 (p. Q705K) variants with rheumatoid arthritis in French and Tunisian populations [J]. *Int J Immunogenet*, 2012, 39(2):131-136
- 9 Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, *et al*. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF- κ B(1.) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e72138
- 10 Migita K, Koga T, Satomura K, *et al*. Serum amyloid A triggers the monosodium urate-mediated mature interleukin-1 β production from human synovial fibroblasts [J]. *Arth Res Ther*, 2012, 14(3):R119
- 11 Kolly L, Busso N, Palmer G, *et al*. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium [J]. *Immunology*, 2010, 129(2):178-185
- 12 Wang T, Zhu CL, Wang S, *et al*. Role of NLRP3 and NLRP1 inflammasomes signaling pathways in pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(10):827-831
- 13 Zhang Y, Zheng Y, Li H. NLRP3 Inflammasome Plays an Important Role in the Pathogenesis of Collagen-Induced Arthritis [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016:9656270
- 14 Ding H, Gao G, Zhang L, *et al*. The protective effects of curculigin A on adjuvant-induced arthritis by inhibiting NF- κ B, MyD88/NLRP3 activation in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 30:43-49

种,动物实验表明其可以显著抑制小鼠和人肿瘤的生长以及转移,目前这些药物正在逐步进入临床试验^[25]。

TGF- β 参与肿瘤免疫抑制微环境的建立,是重要的免疫抑制因子。抑制 TGF- β 的功能,重建抗肿瘤免疫环境将成为治疗肿瘤的一个重要策略,在临床试验中具有很好的抗肿瘤效果,但是其伴发的不良反应需要引起足够重视。因此在肿瘤治疗中,还需更多的基础和临床研究,使 TGF- β 靶向治疗效果更加安全有效。

参考文献

- 1 Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour microenvironment heterogeneity on therapeutic response [J]. *Nature*, 2013, 501 (7467): 346-354
- 2 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144 (5): 646-674
- 3 李越霄, 谭学新, 周青. TGF- β 与头颈部鳞状细胞癌 [J]. *解剖科学进展*, 2014, 20 (6): 571-574
- 4 Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, et al. Targeting the TGF- β pathway for cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 147: 22-31
- 5 Schon HT, Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3 (6): 386-406
- 6 郭秋均, 李杰. 肿瘤相关巨噬细胞在重塑肿瘤免疫微环境中的作用 [J]. *肿瘤*, 2013, 33 (10): 922-927
- 7 王兴, 唐丽. 肿瘤相关巨噬细胞调节抗肿瘤治疗的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32 (5): 693-695, 698
- 8 Rogers TL, Holen L. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates [J]. *J Translat Med*, 2011, 9 (1): 177
- 9 谢冰冰, 董燕, 吴阳阳, 等. 巨噬细胞极化的信号通路及其与疾病的关系 [J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25 (1): 107-112
- 10 Costa NL, Valadares MC, Souza PP, et al. Tumor associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2013, 49 (3): 216-223
- 11 Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (5): 949-955
- 12 王姗, 郑金华, 孟琰, 等. 从细胞因子角度看肿瘤微环境对免疫细胞及肿瘤细胞的影响 [J]. *肿瘤学杂志*, 2015, 21 (3): 237-241
- 13 贺拥军, 岳秋娟, 张敏. 树突细胞在肿瘤免疫逃逸中的作用研究进展 [J]. *国外医学(医学地理分册)*, 2015, 36 (3): 237-239

- 14 Gulubova M, Manolova I, Ananiev J, et al. Relationship of TGF- β 1 and Smad7 expression with decreased dendritic cell infiltration in liver gastrointestinal cancer metastasis [J]. *APMIS*, 2013, 121 (10): 967-975
- 15 刘贤伟, 曹俊达, 熊功友, 等. TGF- β 1, Smad7 与树突状细胞在结直肠癌肝转移中作用的初步研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24 (1): 63-69
- 16 Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, et al. Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91 (9): 545-555
- 17 Imai K, Minamiya Y, Koyota S, et al. Inhibition of dendritic cell migration by transforming growth factor- β 1 increases tumordraining lymph node metastasis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31 (1): 1-9
- 18 Kim YS, Sayers TJ, Colburn NH, et al. Impact of dietary components on NK and Treg cell function for cancer prevention [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54 (9): 669-678
- 19 张国庆, 韩峰, 房新志, 等. CD4 IL-17 和 Foxp3 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2012, 34 (8): 596-599
- 20 Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61 (9): 1373-1385
- 21 Wang L, Chang EW, Wong SC, et al. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric Cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins [J]. *J Immunol*, 2013, 190 (2): 794-804
- 22 Li L, Zhang J, Diao W, et al. MicroRNA-155 and microRNA-21 promote the expansion of functional myeloid-derived suppressor cells [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (3): 1034-1043
- 23 Obermajer N, Kalinski P. Key role of the positive feedback between PGE₂ and COX2 in the biology of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1 (5): 762-764
- 24 Morris JC, Tan AR, Olencki TE, et al. Phase I study of GC1008 (fresolimumab): a human anti-transforming growth factor- β (TGF β) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (3): e90353
- 25 Rodon J, Carducci MA, Sepulveda-Sanchez JM, et al. First-in-human dose study of the novel transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate in patients with advanced cancer and glioma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (3): 553-560

(收稿日期: 2016-09-02)

(修回日期: 2016-09-07)

(接第 13 页)

- 15 Ippagunta SK, Brand DD, Luo J, et al. Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (16): 12454-12462
- 16 Kolly L, Karababa M, Joosten LA, et al. Inflammatory role of ASC in

antigen-induced arthritis is independent of caspase-1, NALP-3, and IPAF [J]. *J Immunol*, 2009, 183 (6): 4003-4012

- 17 Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis [J]. *Nature*, 2014, 512 (7512): 69-73

(收稿日期: 2017-08-06)

(修回日期: 2017-09-08)