

细胞焦亡在狼疮性肾炎发病机制中的研究进展

王 晨 林 栩

摘 要 细胞焦亡 (pyroptosis) 是一种程序性细胞死亡方式,其经典途径表现为炎性小体激活,半胱天冬酶-1 (caspase-1) 活化, Gasdermin D 蛋白 (GSDMD) 切割细胞膜, 炎性介质白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 和白细胞介素-18 (IL-18) 释放;近年来研究也发现鼠的半胱天冬酶-11 (caspase-11) 和人的半胱天冬酶-4/5 (caspase-4/5) 经非经典途径可以直接识别细菌脂多糖类脂 A 组装的炎性小体导致细胞焦亡。狼疮性肾炎作为一种复杂的自身免疫性疾病,多种细胞死亡过程与狼疮性肾炎的发展相关,在狼疮的组织损伤及免疫失调中发挥作用。近年来有研究表明,焦亡也参与狼疮性肾炎的发生、发展,在狼疮性肾炎进展过程中,肾组织中 NLRP3、caspase-1 等参与焦亡的基因表达显著增加,且临床上使用的激素联合治疗方式的内在机制被证明也是通过抑制狼疮性肾炎患者 caspase-1 及 GSDMD 的基因表达。为了进一步了解细胞焦亡在狼疮性肾炎发病机制中扮演着什么样的角色。本文就细胞焦亡的发生机制及其参与狼疮性肾炎疾病的治疗研究做一综述,旨在为狼疮性肾炎靶向诊疗提供理论依据。

关键词 细胞焦亡 狼疮性肾炎 Nod 样受体蛋白 3 半胱天冬酶-1 Gasdermin D 蛋白

中图分类号 R593

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.02.005

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种复杂自身免疫性疾病,累及全身多器官系统,有多种免疫细胞如 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的参与,以多种抗体以及免疫复合物的形成、补体激活为特征。狼疮性肾炎 (lupus nephritis, LN) 是 SLE 患者的常见并发症。临床上以免疫抑制剂合并糖皮质激素为主要治疗手段,虽然病死率及肾脏存活率有所改善,还是有 10% ~ 30% 的狼疮性肾炎发展为肾衰竭,需要肾脏替代治疗^[1,2]。因而早期诊断及规范化治疗对提高狼疮病人生活质量以及改善预后有其重要的意义。随着学术界对细胞程序性死亡的深入了解,目前已有研究表明,细胞焦亡这种新型细胞死亡方式与狼疮性肾炎的疾病进展密切相关。本文就细胞焦亡参与狼疮性肾炎疾病发生、发展机制的研究进展及未来应用前景展开讨论。

一、细胞焦亡

焦亡属于细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 的一种,是混合坏死和凋亡特征的一种非典型细胞死亡方式,在促进人的生长发育以及维持内环境稳态方面具有重要意义^[3]。在 1992 年, Zychlin-

sky 等发现了福氏志贺菌感染的巨噬细胞发生了细胞死亡,该型细胞死亡有细胞凋亡的特征:染色质固缩及 DNA 片段化,当时认定这种细胞死亡方式为细胞凋亡;无独有偶, Hilbi 前后在 1997 年及 1998 年,在观察福氏志贺菌诱导巨噬细胞凋亡的过程中发现了激活的含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶 1 (cysteinyll aspartate specific proteinase 1, caspase-1) 表达,且证明该种死亡方式不依赖于 caspase-3,而是依赖于 caspase-1^[4,5];1999 年, Hersh 等通过敲除巨噬细胞 caspase-1 阻断巨噬细胞死亡,证明 caspase-1 可能是此种细胞死亡方式的关键蛋白^[6]。此后 Brennan 在 2000 年通过沙门菌诱导巨噬细胞死亡实验中也同样发现了该死亡方式与 caspase-1 密切相关,明确提出该种细胞死亡方式不同于细胞凋亡,可以破坏细胞膜,不伴有凋亡相关 caspase-3 及 PARP 的活化,且有明显的 DNA 片段化^[7]。2001 年 Cookson 和 Brennan 等正式以细胞焦亡来命名这种死亡方式^[8]。至此关于细胞焦亡的研究开始飞速发展。2015 年 Gasdermin D 作为焦亡关键效应蛋白被报道,焦亡的下游作用机制逐步完善^[9]。随着对细胞死亡方式的研究以及对相关机制的了解,2018 年细胞死亡命名委员会 (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) 定义细胞焦亡为依赖 Gasdermin 蛋白家族成员形成的质膜孔隙的一种细胞死亡方式,与炎性 caspase 的激活与否没有必然联系,至此学术界对于细胞焦亡的定

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81860131, 82060133); 广西自然科学基金资助项目 (2017 GXNSFAA198288, 2019GXNSFDA245004)

作者单位:533000 百色,右江民族医学院附属医院肾内科

通信作者:林栩,教授,硕士生导师,电子信箱:linyfyf@163.com

义日趋完善^[10]。

细胞焦亡、细胞凋亡及细胞坏死三者同属 PCD，彼此之间在生化和形态学特征虽有相似也各有不同，简言之胞核固缩或断裂，胞膜完整，有凋亡小体形成，为凋亡 (apoptosis) 细胞形态特征；胞核固缩或断裂，胞质肿胀，胞膜不完整，且有炎性小体的形成，为焦亡 (pyroptosis) 细胞形态特征；胞核肿胀或溶解，胞质肿胀，胞膜不完整，且有坏死小体的形成，为坏死 (necrosis) 细胞形态特征。细胞凋亡是一种由基因调控由凋亡小体介导的非炎性细胞程序性死亡方式。细胞坏死和焦亡可引起强烈的细胞炎症，质膜的完整与否是区别细胞凋亡与细胞坏死和焦亡的标志，

细胞坏死中细胞膜通道成孔是由混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain – like protein, MLKL) 介导的，而细胞焦亡则依赖于 Gasdermin 蛋白家族的非选择性打孔特性^[11,12]。根据不同细胞死亡过程中细胞膜通透性的变化，可以通过 Yo – PRO – 1 和 Eth D – 2 双染证实是否发生焦亡现象^[13~16]。Yo – PRO – 1 是一种细胞膜封闭的阳离子，在凋亡早期细胞膜通透性轻微增加，此时 Yo – PRO – 1 可以进入细胞与 DNA 结合形成绿色荧光，Eth D – 2 相对分子质量则较大不能通过焦亡的细胞膜孔进入，而在坏死细胞中可呈现阳性，且有不能与其他染料共存的特性，详见表 1。

表 1 细胞凋亡、焦亡及坏死的比较

项目	细胞凋亡	细胞坏死	细胞焦亡
细胞死亡模式	属细胞程序性死亡	属细胞程序性死亡	属细胞程序性死亡
诱因	生理性	病理性	病理性
细胞形态	细胞皱缩	细胞肿胀	细胞肿胀
细胞质	胞质固缩	内容物释放	内容物释放
细胞核	固缩	核染色质缺失	固缩
细胞膜	起泡 有一定完整性	通道形成活性 完整性丧失	非选择性形成质膜膜孔 完整性丧失
小体形成	凋亡小体	坏死小体	焦亡小体
炎性反应	没有	有	有
炎性范围	散在的 单个细胞死亡	大片的 聚集的细胞死亡	散在的 单个细胞死亡
关键效应蛋白	依赖非炎症性 caspase	MLKL 蛋白	Gasdermin 家族
AnnexinV	凋亡早期阳性	阳性	阳性
PI 染色	凋亡晚期阳性	阳性	阳性
Eth D – 2 染色	阴性	阳性	阴性
Yo – PRO – 1 染色	凋亡早期阳性	阳性	阳性
TUNEL 染色	阳性	阳性	阳性
DNA 电泳	梯状 DNA	弥散性降解	弥散性降解
基因调控	是	否	否

二、细胞焦亡关键蛋白

焦亡主要发生机制为 NOD 样受体 (NLRs) 或 Toll 样受体 (TLRs) 通过识别胞内或胞外的刺激因子，从而促进炎性小体的组装，炎性小体 (inflamma-some) 由 3 个主要部分构成，细胞质传感器 NLR 蛋白 (NOD – containing protein – like receptors)、衔接蛋白凋亡相关斑点蛋白 ASC (apoptotic – associated speck – like protein containing CARD) 和炎性半胱天冬氨酸蛋白酶 – 1 前体蛋白 (pro – caspase – 1)。ASC 作为接头蛋白负责 NLR 蛋白及 pro – caspase – 1 的连接。又根据炎性小体的组成受体不同，分为 NLRP1 炎性小体、NLRP3 炎性小体、AIM2 炎性小体、IPAF 炎性小体。其中 NLRP1 炎性小体及 IPAF 炎性小体可以不依赖于接头蛋白 ASC 可以直接与 pro – caspase – 1 连

接^[17]。炎性小体在细胞焦亡中起承上启下的关键作用，炎性小体是一类可以在胞内识别病原体相关分子模式 (PAMPs) 和损伤相关分子模式 (DAMPs) 信号的受体。通过识别上游刺激，募集并活化 caspase – 1，活性 caspase – 1 切割下游关键蛋白 GSDMD，形成有细胞毒性的 GSDMD – N 端，激活下游炎性细胞因子 IL – 1β、IL – 18。最终导致细胞焦亡。活化的 caspase 切割 GSDMD – N 端及 GSDMD – C 端之间的柔性连接蛋白从而解除 C 端的自身抑制效应，以此激活 Gasdermin。Gasdermin 蛋白作为一种打孔蛋白可以在细胞膜上形成功能性孔隙，导致细胞肿胀破裂，胞内炎性物质释放激活并放大炎性反应。以下就 caspase 家族及 Gasdermin 家族在细胞焦亡这一过程中的作用机制作简略阐述。

caspase 家族首先是作为细胞凋亡的关键蛋白而被人们熟知,随着研究的不断深入,caspase 家族的其他功能也被渐渐发掘。目前已知 caspase 家族有 16 个成员,序列及结构高度相似,主要以 N 端前域结构的不同而鉴别,通常以无活性的酶原形式存在。这其中以 caspase - 1 研究历史最为久远,参与多种疾病的发生、发展。caspase - 1 最早是作为白细胞介素 (IL) - 1 β 转换酶 (ICE) 被发现,且与 1993 年发现的线虫凋亡相关的蛋白 CED - 3 具有同源性。

目前认为细胞焦亡主要是由 caspase - 1/4/5/11 介导的一种细胞程序性死亡。根据 caspase 的不同区分焦亡的经典与非经典途径。依赖于 caspase - 1 的细胞死亡方式称为经典焦亡途径,在内源性或者外源性危险信号刺激下,炎性小体组装活化,炎性小体活化后将 pro - caspase - 1 激活为活化的 caspase - 1,并介导促进白细胞介素 - 1 β 和 IL - 18 等炎性细胞物质的成熟及释放,从而招募更多的炎性细胞一步放大炎性反应。依赖人源 caspase - 4/5 和鼠源的 caspase - 11 的细胞死亡方式称为非经典焦亡途径,脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 不依赖与 TLR4 可以直接通过与 CARD 域 (caspase 募集结构域) 结合激活 caspase - 4/5/11^[9,18,19]。活化后的 caspase - 4/5/11 同样可以通过切割下游 GSDMD,使后者 C 端结构域与 N 端结构域分离,暴露 N 端结构域,解除 GSDMD 的自身抑制作用。2015 年有研究者发现缝隙连接蛋白 1 (pannexin - 1, Panx - 1) 及膜通道嘌呤能受体蛋白 P2X7 (purinergic receptor P2X ligand - gated ion channel 7) 在非经典途径中发挥不可或缺的作用^[20]。也有研究发现 caspase - 3 可以通过切割 GSDME 并引发焦亡。

Gasdermins 家族是一类在细胞焦亡的下游通路发挥活性的具有打孔功能的蛋白家族。包括 Gasdermin - A (GSDMA)、Gasdermin - B (GSDMB)、Gasdermin - C (GSDMC)、Gasdermin - D (GSDMD)、Gasdermin - E (GSDME/DFNA5) 和 Pejvakin (PJVK/DFNB59)。其中 GSDMD 及 GSDME 在细胞焦亡中发挥主要作用,GSDMD 的 N 端具有细胞毒性,C 端与 N 端在静息状态下结合抑制不发挥毒性作用。当 caspase 活化后,可激活 GSDMD 解除自身抑制。该 N 端结构域具有在膜上打孔的作用,可导致细胞膜孔洞形成,细胞不断膨胀直至破裂,细胞内容物 IL - 1 β 和 IL - 18 等释放,从而激活并放大炎性反应,引发细胞焦亡^[21]。

三、细胞焦亡在 LN 的炎症进展中发挥重要作用

无菌性炎性反应是许多临床肾脏疾病的特征,SLE 及 LN 中炎症机制的失调,可以促进 LN 的器官损害,已有研究表明细胞焦亡在 SLE 和 LN 疾病发展过程中起重要作用,细胞焦亡可能成为系统性红斑狼疮的一种重要发病机制^[22]。研究证实,NLRP3 炎症体的激活以及其介导下游 caspase - 1 依赖的细胞因子 IL - 1 β 和 IL - 18 的释放,导致 Gasdermin D 介导的致死性细胞焦亡^[23]。在 LN 患者和狼疮易感小鼠的足细胞中 NLRP3 炎性小体及 caspase - 1 的活性片段 p20 被激活,且抑制 NLRP3 的激活可以减少狼疮性肾炎 IL - 1 β 、caspase - 1 的表达、足细胞损伤和蛋白尿的产生^[24]。

2011 年 Kahlenberg 等在狼疮性肾炎活检组织中检测到 NLRP3、caspase - 1 和血清 IL - 18 表达的增加^[25]。提示这一组织为炎性小体的激活及细胞焦亡的发生做准备。2013 年该课题组又发现 SLE 患者中发现中性粒细胞胞外杀伤网格 (neutrophil extracellular traps, NETs) 增多,可激活巨噬细胞中的 NLRP3 小体,促进 caspase - 1 的活化及 IL - 1 β 和 IL - 18 的释放,诱导细胞焦亡的产生,IL - 18 能够再次诱发 NETs,循环加重 SLE 的发展及器官损害^[26]。2014 年 Kahlenberg 等^[27]通过进一步构建狼疮小鼠模型,发现缺乏炎性小体中枢 caspase - 1 的小鼠不表现出 SLE 和 LN 的症状。在 LN 中,Pim - 1 可以激活 NLRP3 炎性小体导致焦亡通路的进一步活化,而在沉默 Pim - 1 基因的足细胞中 NLRP3、caspase - 1、p20 及 IL - 1 β 的活性则明显降低,这同样提示了细胞焦亡通路激活在 SLE 及 LN 发病机制中的重要作用^[28]。也有研究者提出在 LN 中不仅有焦亡通路活性的增强,焦亡细胞的清除障碍可能会导致狼疮患者长期暴露自身抗原从而破坏免疫耐受进一步推动 SLE 的发病^[29,30]。但这一观点还需要更多临床研究数据证实。

四、展 望

细胞焦亡发现以来,研究者通过对细胞焦亡的定义、打破、再定义、再打破。随着对细胞焦亡的了解不断深入,作用机制也逐渐明朗。大量研究表明细胞焦亡在许多肿瘤免疫及心血管疾病发病机制中发挥了重要作用。学术界关于狼疮与焦亡的研究空间很大,其中抑制细胞焦亡的过度激活并加速焦亡细胞的清除有可能是一种有力的狼疮治疗措施。未来的研究可以针对 caspase 的激活机制及与 GSDMD 的直接作

用关系,实现精准用药,使导入体内的细胞焦亡关键蛋白 caspase - 1 及 GSDMD 等抑制剂直接作用于狼疮关键靶点。

参考文献

- 1 Parikh SV, Almaani S, Brodsky S, *et al.* Update on lupus nephritis: core curriculum 2020[J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(2): 265 - 281
- 2 Hoi AY, Morand EF. Treatment update in systemic lupus erythematosus[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2021, 47(3): 513 - 530
- 3 Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 3 - 11
- 4 Hilbi H, Chen Y, Thirumalai K, *et al.* The interleukin 1beta - converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri* - induced apoptosis in human monocyte - derived macrophages[J]. *Infect Immun*, 1997, 65(12): 5165 - 5170
- 5 Hilbi H, Moss JE, Hersh D, *et al.* *Shigella* - induced apoptosis is dependent on caspase - 1 which binds to IpaB[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(49): 32895 - 32900
- 6 Hersh D, Monack DM, Smith MR, *et al.* The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase - 1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2396 - 2401
- 7 Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase - 1 - dependent necrosis[J]. *Mol Microbiol*, 2000, 38(1): 31 - 40
- 8 Cookson BT, Brennan MA. Pro - inflammatory programmed cell death[J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3): 113 - 114
- 9 Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, *et al.* Caspase - 11 cleaves gasdermin D for non - canonical inflammasome signalling[J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 666 - 671
- 10 Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486 - 541
- 11 Zhang Y, Chen X, Gueydan C, *et al.* Plasma membrane changes during programmed cell deaths[J]. *Cell Res*, 2018, 28(1): 9 - 21
- 12 Chen X, He WT, Hu L, *et al.* Pyroptosis is driven by non - selective gasdermin - D pore and its morphology is different from MLKL channel - mediated necroptosis[J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007 - 1020
- 13 Rat P, Olivier E, Tanter C, *et al.* A fast and reproducible cell - and 96 - well plate - based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO - PRO - 1 fluorescent dye[J]. *J Biol Methods*, 2017, 4(1): e64
- 14 Wang H, Zhou X, Li H, *et al.* Transient receptor potential melastatin 2 negatively regulates LPS - ATP - induced caspase - 1 - dependent pyroptosis of bone marrow - derived macrophage by modulating ROS production[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 2975648
- 15 李娜, 穆亚平, 刘春英, 等. 黄芪甲苷对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 NLRP3 炎性小体表达的影响[J]. *中国当代儿科杂志*,

- 2021, 23(4): 402 - 409
- 16 叶玲玲, 刘红, 李世崇, 等. 用 YO - PRO - 1 和 PI 联合染色定量检测细胞凋亡[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 10: 50 - 53
- 17 Ball DP, Taabazuing CY, Griswold AR, *et al.* Caspase - 1 interdomain linker cleavage is required for pyroptosis[J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3(3): e202000664
- 18 Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, *et al.* Cytoplasmic LPS activates caspase - 11: implications in TLR4 - independent endotoxic shock[J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1250 - 1253
- 19 Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4[J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1246 - 1249
- 20 Yang D, He Y, Munoz - Planillo R, *et al.* Caspase - 11 requires the pannexin - 1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock[J]. *Immunity*, 2015, 43(5): 923 - 932
- 21 Ding J, Wang K, Liu W, *et al.* Pore - forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111 - 116
- 22 Kahlenberg JM, Kaplan MJ. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2014, 26(5): 475 - 481
- 23 Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8): 477 - 489
- 24 Fu R, Guo C, Wang S, *et al.* Podocyte activation of NLRP3 inflammasomes contributes to the development of proteinuria in lupus nephritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(8): 1636 - 1646
- 25 Kahlenberg JM, Thacker SG, Berthier CC, *et al.* Inflammasome activation of IL - 18 results in endothelial progenitor cell dysfunction in systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol*, 2011, 187(11): 6143 - 6156
- 26 Kahlenberg JM, Carmona - Rivera C, Smith CK, *et al.* Neutrophil extracellular trap - associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages[J]. *J Immunol*, 2013, 190(3): 1217 - 1226
- 27 Kahlenberg JM, Yalavarthi S, Zhao W, *et al.* An essential role of caspase 1 in the induction of murine lupus and its associated vascular damage[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1): 152 - 162
- 28 Fu R, Xia Y, Li M, *et al.* Pim - 1 as a therapeutic target in lupus nephritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(8): 1308 - 1318
- 29 Mistry P, Kaplan MJ. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis[J]. *Clin Immunol*, 2017, 185: 59 - 73
- 30 Yang F, He Y, Zhai Z, *et al.* Programmed cell death pathways in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 3638562

(收稿日期: 2022 - 04 - 14)

(修回日期: 2022 - 05 - 06)