

Nod样受体蛋白3炎性小体在脑缺血再灌注损伤中的研究现状

■ 丁承程, 李国忠

【摘要】 缺血再灌注损伤作为缺血性卒中的主要病理生理过程, 能够引发固有免疫应答, 导致无菌性炎症。越来越多的研究表明, 固有免疫在脑缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用, 其中Nod样受体蛋白3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3) 作为模式识别受体能够在机体受到损伤时识别损伤相关分子模式, 形成炎性小体, 引发炎症因子趋化及炎症损伤。本文对NLRP3炎性小体的结构、功能、信号通路及其在脑缺血再灌注损伤中作用的研究进展进行介绍。

【关键词】 Nod样受体蛋白3; 缺血再灌注; 炎性小体

【DOI】 10.3969/j.issn.1673-5765.2019.05.021

作者单位

150001 哈尔滨
哈尔滨医科大学第一临床医学院神经内科一病房

通信作者

李国忠
hydlgz1962@163.com

Advance in Nod-like Receptor Protein 3 Inflammasome in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

DING Cheng-Cheng, LI Guo-Zhong. Department of Neurology, The First Hospital Affiliated Harbin Medical University, Harbin 100051, China

Corresponding Author: LI Guo-Zhong, E-mail:hydlgz1962@163.com

【Abstract】 Ischemia reperfusion injury after recanalization in ischemic stroke can trigger innate immune reaction, which can cause aseptic inflammation. More and more studies revealed that innate immune response played a critical role in ischemia reperfusion injury. When injury occurs, nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome, a pattern recognition receptor, can be directly activated via external pathological signals known as pathogen-associated molecular patterns and endogenous damage-associated molecular patterns, which can activate intracellular innate immune receptors and cause immune reaction. This article reviewed the structure, function and signal pathways of NLRP3 inflammasome, and pathological mechanism of NLRP3 in ischemia reperfusion injury.

【Key Words】 Nod-like receptor protein; Ischemia reperfusion; Inflammasome

Nod样受体蛋白3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎性小体是骨髓源性的巨噬细胞中的固有免疫相关蛋白复合物, 除了能够参与介导、调控多种免疫反应, 介导细胞死亡和组织损伤, 还促进了脑缺血再灌注损伤的发生发展。NLRP3炎性小体的激活是一个多因素参与的过程, 目前对于其机制的研究尚不明确, 本文对NLRP3炎性小体与脑缺血再灌注关系的研究现状和进展进行介绍。

1 Nod样受体蛋白3炎性小体

炎性小体是胞内蛋白复合物, 典型组成包括Nod样受体 (nod-like receptor, NLR)、

凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和半胱天冬酶-1 (pro-caspase-1) 前体^[1]。

NLR是一类胞内模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs), 由N端结构域、C端结构域和中央的核苷酸结合寡聚化结构域组成。其中N端结构域已知有4种: 嘌呤结构域 (pyrin domain, PYD)、caspase募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD)、杆状病毒IAP重复序列 (baculoviral IAP repeat, BIR) 结构域和酸性反式激活结构域。ASC由PYD和CARD两部分组成, 这两部分作为双重接头蛋白分子, 以桥梁的形式将

NLRP3及半胱天冬酶原-1连接起来形成炎性小体。每个NLRP3炎性小体有两个半胱天冬酶原-1, ASC通过调节两个单体的空间构象,使之成为有活性的半胱天冬酶-1 (p20) 和无活性的半胱天冬酶原 (p10) 两个亚基。p20能够剪切白介素前体 (pro-IL) -1 β 和pro-IL-18,引起细胞凋亡^[1]。

2 Nod样受体蛋白3炎性小体的活化机制

NLRP3可识别多种激活物,外源性的激活物常见多种细菌,内源性的有尿酸盐结晶、ATP、脂质体、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、补体、淀粉样小体和错误折叠的蛋白等^[2]。

NLRP3炎性小体在体内处于自身抑制状态,但是易于被激活。脑缺血再灌注时会发生自由基损伤、钙超载、微循环障碍及白细胞 (主要是中性粒) 损伤作用,这些损伤都能够被NLRP3识别。NLRP3炎性小体的活化机制还未完全明确,目前认为有以下几种。

2.1 活性氧及线粒体功能紊乱介导活化机制

ROS可引起氧化应激导致细胞凋亡,在脑缺血再灌注时大量产生ROS。其来源一般有两种:线粒体和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)。线粒体的活性氧 (mitochondrial ROS, mROS) 作为线粒体的产物能激活NLRP3炎性小体,也是形成成熟IL-1 β 所需的第二信号^[3]。有研究表明,用mROS清除剂二苯基氯化碘 (diphenyliodonium chloride, DPI) 处理小鼠的巨噬细胞后,脂多糖诱导的NLRP3及IL-1 β 、IL-18表达量降低,但这一现象只在NLRP3炎性小体启动的这一过程能够观察到^[4]。细胞质中NADPH氧化酶产生的ROS最初被认为是NLRP3炎性小体活化所需信号,并且有化学抑制剂的实验支持这一理论^[5]。有研究显示,人外周血单核细胞和鼠的巨噬细胞缺乏有活性的

NADPH氧化酶,但是仍能观察到有NLRP3炎性小体的活化^[6]。

用化学抑制剂扰乱线粒体功能,可观察到NLRP3炎性小体的激活^[7]。然而,化学抑制剂会产生副产物,尤其在高浓度的时候,所以该机制尚有争议。另外,氧化的线粒体的DNA释放到细胞质中,能与NLRP3相互作用,并引起NLRP3下游的活化^[8]。

2.2 低氧介导激活

脑缺血再灌注损伤伴随着低氧,造成线粒体结构和功能受损,神经递质失调及酸碱平衡紊乱。有研究证实,小鼠在脑低氧环境下能够增加NLRP3的基因及其蛋白的表达,并通过限制pro-IL-1 β 的自噬使其水平升高。脑缺氧早期,海马和丘脑的星形胶质细胞中就能观察到NLRP3,之后发现星形胶质细胞和小胶质细胞均有表达^[9]。另有研究表明,人前列腺上皮细胞在低氧环境下有NLRP3、黑色素瘤缺乏因子-2 (absent in melanoma 2, AIM-2) 和pro-IL-1 β 的表达升高。

2.3 钾外流介导激活

在经典通路及非经典通路中钾离子外流都是NLRP3炎性小体活化的必需条件^[10]。大部分NLRP3的激活物,如ATP、尼日利亚菌素和颗粒物都能够造成钾离子外流,从而引起NLRP3炎性小体活化。在非细胞系统中,低浓度的钾离子也能够引发NLRP3炎性小体聚集^[11]。钾离子的外流加速了NLRP3炎性小体的活化。在钾离子无法外流的情况下,NLRP3炎性小体在巨噬细胞中发生活化突变体,且不被细胞外高钾离子浓度所影响^[12]。这提示了细胞内钾离子浓度的降低可能诱发NLRP3炎性小体构象的改变。

2.4 溶酶体破裂

颗粒物通过细胞内吞作用、损伤溶酶体膜,导致组织蛋白酶B释放到细胞质中,从而激活NLRP3炎性小体^[13]。释放到细胞质中的组织蛋白酶B、颗粒物也引起K离子外流,进一步激活NLRP3炎性小体^[14]。用组织蛋白酶B抑制剂CA-074-Me处理巨噬细胞能导致NLRP3活化被抑制。但组织蛋白酶B缺陷

的巨噬细胞中NLRP3无法被微粒物质激活,而IL-1 β 并没有减少,因此推测溶酶体破裂释放组织蛋白酶B在激活NLRP3炎性小体中仅起到部分作用^[15]。

2.5 其他机制 NLRP3炎性小体的活化多需要钙离子的参与,一方面是因为钙离子动员可引起钾离子外流,另一方面是因为脑缺血再灌注时,钙超载促进线粒体损伤,释放更多ROS,进一步活化NLRP3炎性小体。但是钙离子对AIM2和NLR家族CARD域蛋白4 (NOD-like receptor family CARD-containing 4 protein, NLRC4) 炎性小体的活化没有作用^[16]。钙离子螯合剂可抑制IL-1 β 的分泌^[17]。内质网作为细胞内钙池在此过程中起重要作用,使用药物抑制剂或是shRNA敲除内质网上的钙离子释放通道,可减弱钙离子动员及NLRP3炎性小体活化^[18]。

3 脑缺血情况下可影响NLRP3炎性小体的药物

3.1 夹竹桃麻素 NADPH和夹竹桃麻素都能显著减少脑缺血再灌注损伤引起的NADPH氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX) 2、NOX4和ROS的增加,显著抑制核因子 κ B抑制蛋白(inhibitor of nuclear factor- κ B α , I κ B α)磷酸化和降解, NF- κ Bp65的核定位,还有NF- κ B靶基因环氧合酶(cyclooxygenase, COX) 2的表达和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)的表达。在大鼠脑梗死模型中, NADPH和夹竹桃麻素都能抑制缺血的大脑皮层NLRP3、ASC、半胱天冬酶-1、IL-1 β 和IL-18的表达,并能减少脑梗死体积,提高梗死后的存活率及神经功能的恢复^[19]。

3.2 鸢尾素 鸢尾素是骨骼肌来源的激素,可在不同物种的各种组织中合成,有抗脑缺血性损伤及脑保护作用。研究表明,神经元氧糖剥夺后,鸢尾素及其前体蛋白Ⅲ型纤维蛋白结构域5表达明显减少,而氧化应激和ROS-NLRP3信

号被激活;用鸢尾素或NLRP3抑制剂能够抑制氧糖剥夺引起的氧化应激和炎症,且鸢尾素的调节作用可被NLRP3过表达抑制。因此,鸢尾素可能通过抑制ROS-NLRP3信号通路减轻氧糖剥夺引起的神经元损伤^[20]。

3.3 核因子E2相关因子2相关药物 有研究表明核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor-2, Nrf2)在脑缺血再灌注损伤中能通过硫氧还蛋白(thioredoxin-1, Trx1)/硫氧还蛋白结合蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)抑制NLRP3炎性小体的形成的,从而起到脑保护作用。TXNIP从Trx1/TXNIP复合体分离下来,与NLRP3活化密切相关。在肝损伤和严重的狼疮性肾炎患者中证实, Nrf2能促进抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)基因激活,抑制NLRP3炎性小体活化。小鼠大脑中动脉闭塞模型中,叔丁基对苯二酚治疗上调Nrf2之后, TXNIP、NLRP3及caspase-1、IL-18、IL-1 β 的表达均明显减少,而敲除Nrf2和Trx1则相反,在敲除Trx1时还抑制了Nrf2的保护作用。该研究认为,在脑缺血再灌注损伤时Nrf2通过对Trx1/TXNIP复合体的调节抑制NLRP3炎性小体的活化^[21]。

在氧糖剥夺再灌注模型建立之前用叔丁基对苯二酚或Nrf2 CRISPR质粒对BV2细胞做预处理, Nrf2活化可抑制NLRP3炎性小体的表达及下游IL-1 β 的形成。并且, NLRP3炎性小体的活化对ROS水平很敏感, Nrf2能够降低ROS的产生。另外,作为一个Nrf2靶向ARE的基因, NADPH醌氧化还原酶参与了NLRP3炎性小体的抑制^[22]。这给脑缺血再灌注损伤提供了一个新的治疗靶点。

3.4 白藜芦醇 白藜芦醇是一种特异的去乙酰化酶沉默接合型信息调节因子2同源蛋白1(silent mating-type information regulator2 homolog 1, Sirt1)激动剂,有研究表明它通过抑制NLRP3炎性小体活化后Sirt1依赖的自噬

活动来改善脑缺血再灌注损伤。在大鼠大脑中动脉闭塞模型中,病变侧大脑半球NLRP3、半胱天冬酶-1、IL-1 β 和IL-18表达上升,并上调自噬活动。白藜芦醇可减轻缺血再灌注损伤中NLRP3炎性小体引起的炎症反应,下调自噬,减小脑梗死体积、减轻脑水肿,提高大鼠的神经功能评分。该抑制作用能够被脑室内的注射白藜芦醇抑制剂3-MA阻断。转染Sirt1小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 能阻断白藜芦醇对自噬活动的抑制,并抑制NLRP3炎性小体的活化^[23]。

3.5 萝卜硫素 萝卜硫素 (sulforaphane, SFN) 对脑缺血再灌注损伤有保护作用,但其机制尚不清楚。用SFN处理大脑中动脉闭塞大鼠,可抑制炎性小体活化及半胱天冬酶-1、IL-1 β 和IL-18的表达,减少脑梗死体积,提高神经功能评分,减少中性粒细胞浸润^[24]。

3.6 其他 有研究提示,间歇性禁食、静脉注射免疫球蛋白、米诺环素、大黄酚、酪氨酸激酶等均能在脑缺血再灌注中抑制NLRP3炎性小体的活化^[25-29]。伞形花内酯可通过上调过氧化物酶体增殖剂激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR) γ 的表达抑制TXNIP/NLRP3炎性小体^[30]。

综上所述,NLRP3在脑缺血再灌注损伤中是通过形成炎性小体,介导IL-1 β 等的产生,在固有免疫中起重要作用。很多针对NLRP3炎性小体的药物也在动物实验中取得良好的效果。但是由于鼠NLR家族成员与人NLR家族成员不完全相同,NLRP3炎性小体在人体中确切活化机制仍不明确,人体中NLRP3对炎症损伤的介导机制及治疗靶点仍需进一步研究。

参考文献

- [1] OZAKI E, CAMPBELL M, DOYLE S L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives[J/OL]. *J Inflamm Res*, 2015, 8: 15-27. <https://www.dovepress.com/targeting-the-nlrp3-inflammasome-in-chronic-inflammatory-diseases-curr-peer-reviewed-article-jir>.
- [2] LEE H M, KANG J, LEE S J, et al. Microglial activation of the NLRP3 inflammasome by the priming signals derived from macrophages infected with mycobacteria[J]. *Glia*, 2013, 61 (3) : 441-452.
- [3] PATEL M N, CARROLL R G, GALVÁN-PEÑA S, et al. Inflammasome priming in sterile inflammatory disease[J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23 (2) : 165-180.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] VAN BRUGGEN R, KÖKER M Y, JANSEN M, et al. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent[J]. *Blood*, 2010, 115 (26) : 5398-5400.
- [7] LIU Q, ZHANG D, HU D, et al. The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J/OL]. *Mol Immunol*, 2018, 103: 115-124. doi: 10.1016/j.molimm.2018.05.002. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589018304929>.
- [8] SHIMADA K, CROTHER T R, KARLIN J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis[J]. *Immunity*, 2012, 36 (3) : 401-414.
- [9] YSTGAARD M B, SEJERSTED Y, LØBERG E M, et al. Early Upregulation of NLRP3 in the Brain of Neonatal Mice Exposed to Hypoxia-Ischemia; No Early Neuroprotective Effects of NLRP3 Deficiency[J]. *Neonatology*, 2015, 108 (3) : 211-219.
- [10] TANNAHILL G M, CURTIS A M, ADAMIK J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α [J]. *Nature*, 2013, 496 (7444) : 238-242.
- [11] MOON J S, HISATA S, PARK M A, et al. mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation[J]. *Cell Rep*, 2015, 12 (1) : 102-115.
- [12] LIU X, ZHOU W, ZHANG X, et al. Dimethyl fumarate ameliorates dextran sulfate sodium-induced murine experimental colitis by activating Nrf2 and suppressing NLRP3 inflammasome activation[J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 112: 37-49. doi: 10.1016/j.bcp.2016.05.002. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295216300752>.
- [13] CHU J, THOMAS L M, WATKINS S C, et al. Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 β from murine macrophages in a

- NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86 (5) : 1227-1238.
- [14] MUÑOZ-PLANILLO R, KUFFA P, MARTÍNEZ-COLÓN G, et al. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter[J]. *Immunity*, 2013, 38 (6) : 1142-1153.
- [15] DOSTERT C, GUARDA G, ROMERO J F, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal[J/OL]. *PLoS One*, 2009, 4 (8) : e6510. doi: 10.1371/journal.pone.0006510. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0006510>.
- [16] MOON J S, LEE S, PARK M A, et al. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125 (2) : 665-680.
- [17] LAMPROPOULOU V, SERGUSHICHEV A, BAMBOUSKOVA M, et al. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation[J]. *Cell Metab*, 2016, 24 (1) : 158-166.
- [18] WEN H, GRIS D, LEI Y, et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12 (5) : 408-415.
- [19] QIN Y Y, LI M, FENG X, et al. Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke[J/OL]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104 : 333-345. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.023. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584917312741>.
- [20] PENG J, DENG X, HUANG W, et al. Irisin protects against neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation in part depends on the inhibition of ROS-NLRP3 inflammatory signaling pathway[J/OL]. *Mol Immunol*, 2017, 91 : 185-194. doi: 10.1016/j.molimm.2017.09.014. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589017305138>.
- [21] HOU Y, WANG Y, HE Q, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury[J/OL]. *Behav Brain Res*, 2018, 336 : 32-39. doi: 10.1016/j.bbr.2017.06.027. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432817307210>.
- [22] XU X, ZHANG L, YE X, et al. Nrf2/ARE pathway inhibits ROS-induced NLRP3 inflammasome activation in BV2 cells after cerebral ischemia reperfusion[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67 (1) : 57-65.
- [23] HE Q, LI Z, WANG Y, et al. Resveratrol alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50 : 208-215. doi: 10.1016/j.intimp.2017.06.029. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576917302588>.
- [24] YU C, HE Q, ZHENG J, et al. Sulforaphane improves outcomes and slows cerebral ischemic/reperfusion injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in rats[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 45 : 74-78. doi: 10.1016/j.intimp.2017.01.034. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576917300553>.
- [25] FANN D Y, SANTRO T, MANZANERO S, et al. Intermittent fasting attenuates inflammasome activity in ischemic stroke[J/OL]. *Exp Neurol*, 2014, 257 : 114-119. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.017. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488614001198>.
- [26] FANN D Y, LEE S Y, MANZANERO S, et al. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 : e790. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.326>.
- [27] ZHANG N, ZHANG X, LIU X, et al. Chrysophanol inhibits NALP3 inflammasome activation and ameliorates cerebral ischemia/reperfusion in mice[J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014 : 370530. doi: 10.1155/2014/370530. <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/370530/>.
- [28] ITO M, SHICHITA T, OKADA M, et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury[J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6 : p7360. doi: 10.1038/ncomms8360. <https://www.nature.com/articles/ncomms8360>.
- [29] LU Y, XIAO G, LUO W. Minocycline Suppresses NLRP3 Inflammasome Activation in Experimental Ischemic Stroke[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2016, 23 (4) : 230-238.
- [30] WANG X, LI R, WANG X, et al. Umbelliferone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via upregulating the PPAR gamma expression and suppressing TXNIP/NLRP3 inflammasome[J/OL]. *Neurosci Lett*, 2015, 600 : 182-187. doi: 10.1016/j.neulet.2015.06.016. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394015004590>.

(收稿日期: 2018-09-15)



【点睛】 Nod样受体蛋白3炎性小体能够识别脑缺血再灌注的损伤信号并诱发炎症趋化, 最终引起脑组织损伤。