

NALP3 炎性体在痛风发病中的作用

贺玲玲 赵东宝

NALP3 炎性体是一类细胞内模式识别受体,同 Toll 样受体(toll-like receptors, TLR)一样,是固有免疫系统对病原体的一种重要感受器,广泛参与对病原体上病原相关分子模式(PAMP)的识别,同时也可感知内源性危险信号相关分子模式(DAMP),产生相应的炎症应答反应。近期研究显示,NALP3 炎性体与痛风炎症发生密切相关。单钠尿酸盐(MSU)晶体作为一个危险信号能被模式识别受体识别,活化多个过程最终导致 NALP3 炎性体形成,促进白细胞介素 1 β (IL-1 β)前体转化为成熟的 IL-1 β ,诱导痛风炎症发生。本文就 NALP3 炎性体的生物学作用、活化调控以及炎性体介导的 MSU 沉积时固有免疫炎症反应的机制作一综述。

一、MSU 和固有免疫

早在 1987 年 Giovine 等就发现 MSU 能刺激单核细胞/巨噬细胞和滑膜细胞释放 IL-1 β 。而最近有学者分析介导这种分子间的相互作用时,发现固有免疫发挥着重要作用,主要包括一定范围的受体和可溶性蛋白,能够通过模式识别序列识别病原体和受损或死亡细胞释放的细胞产物。结合这些固有免疫受体,可导致细胞活化及释放细胞因子和化学趋化因子,构建炎症起始反应。TLR 是固有免疫受体家族之一,属于跨膜受体,可结合细胞外配体触发细胞活化和增生。缺乏 TLR2 或 TLR4 的小鼠骨髓源性巨噬细胞的研究显示吞噬 MSU 晶体能力下降,释放促炎性细胞因子 IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)也减少,提示这些 TLR 受体在 MSU 诱导的炎症反应中必不可少。然而 TLR 的作用可能不像其他细胞暴露与 MSU 所表现出那么重要,因为在腹膜的炎性模型中,TLR 缺乏的小鼠没有表现出主要的表型。这两个相互矛盾的结果推测可能是由于在不同组织中,对 MSU 刺激的反应通过不同的机制。而最近的研究表明,TLR 可能通过调节 IL-1 β 前体的合成发挥间接作用,而不是识别 MSU 晶体。CD14 是另一个模式识别分子,存在于细胞表面和循环中,主要发挥扩大 TLR2 或 TLR4 激发的细胞反应,鼠缺乏 CD14 显示 IL-1 β 产生水平下降,这些均说明固有免疫参与 MSU 诱发的痛风炎症反应。

固有免疫系统的特点是能通过 PAMP 和 DAMP 识别一系列病原体(病毒、细菌和真菌等)、细胞坏死或感染后由细胞膜和溶酶体受损所释放的内源性分子以及细胞外 ATP 和 MSU 晶体等。这些由模式识别受体介导,包括 TLR 和 NOD 样受体(NLR)。TLR 为 I 型跨膜蛋白,主要特点是结构功能区富含亮氨酸重复序列,可介导 PAMP/DAMP 识别。胞内的 NLR 同 TLR 一样,能识别 PAMP 和 DAMP,已经成为研究针对外源性激动剂和内源性分子诱导免疫反应的一个重要靶点。

二、NALP3 炎性体

(一)NALP3 的结构

NALP 蛋白家族是新近发现的固有免疫模式识别受体,属于 NLR 家族^[1]。目前已经发现的有 NALP 1~14,其中,NALP3 是 NALP 蛋白家族中的典型代表,对其研究的最多^[2],也称作 cryopyrin 或 PYPAF1,其编码基因位于染色体 1q44 上,由 3 个结构域组成:(1)LRR:位于分子 C 端富含亮氨酸的区域,主要通过蛋白间以及蛋白与糖脂的相互作用探测和识别病原体及其他配体;(2)NACHT 结构域:位于 NALP 分子的中央,对于 NALP 分子的寡聚体化和活化非常重要,它的 C 端包含一个 NACHT 相关结构域(NACHT-associated domain, NAD);(3)效应结构域:位于 NALP 分子 N 端的一个热蛋白结构域(pyrin domain, PYD)。除通过 LRR 识别其配体胞壁酰二肽(MDP)之外,NALP3 还可以通过 LRR 识别并结合尿酸钠晶体、ATP、内毒素和细胞裂解产物等危险信号启动炎症反应^[3]。

(二)NALP3 炎性体的组成和分布

NALP3 与配体结合后发生结构变化,并募集凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein, ASC)及半胱天冬酶(Caspase)形成复杂的复合物——NALP3 炎性体^[4]。ASC 由 PYD 及 CARD 两个结构域组成,其 PYD 结构域与 NALP3 中的 PYD 相结合,而 CARD 结构域通过同型结构域募集 Caspase-1 的 CARD 结构域。Caspase-1 也称 IL-1 β 转化酶(IL-1 β -converting enzyme, ICE),将胞内无活性 IL-1 β 前体的 116 位天冬氨酸裂解,并释放具有活性的 IL-1 β 至胞外。IL-1 β 是固有免疫反应中起关键作用的前炎症因子,作为免疫和炎症反应的介质,参与许多生物过程。NALP3 主要表达于单核巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、T 细胞、B 细胞、上皮细胞、内皮细胞及成骨细胞中,在体内主要分布在皮肤、关节、眼睛、耳朵、口咽、食管、膀胱及输尿管等胞膜与胞质中^[5]。

三、NALP3 炎性体在急、慢性痛风中的作用

(一)NALP3 炎性体在 MSU 诱导的炎症反应

虽然人类认识痛风的诱因已经一个世纪之多,但是 MSU 晶体诱导炎症的潜在机制仅仅最近才被揭示。痛风发作典型的病理生理标志是大量中性粒细胞募集进入滑膜和关节液。然而正常的关节在 MSU 沉积后起初中性粒细胞是缺乏的,认为可能 MSU 晶体与关节固有细胞相互作用,反过来触发中性粒细胞募集,这主要是指滑膜内层细胞。最近体外研究提示单核吞噬细胞在 MSU 沉积的起始反应中发挥重要作用,暴露于单核细胞系的 MSU 晶体可导致促炎性细胞因子产生,特别是 IL-1 β ,现在也认为吞噬 MSU 是这个过程的核心^[6]。Martinon 等^[5]证实 NALP3 能识别凋亡细胞释放出的尿酸结晶,使无活性状态的 NALP3 信号通路活化,活化的 NALP3 炎性体可诱导 IL-1 β 和 IL-18 的成熟和分泌,引起炎症反应。进一步动物实验研究显示给基因缺陷小鼠注入 MSU 诱导炎症反应,证实了组成 NALP3 炎性体的 NALP3 $-/-$ 、ASC $-/-$ 、Caspase $-/-$ 都将使 IL-1 β 的成熟和释放受到明显抑制^[7],说明 NALP3 信号通路在尿酸钠晶体触发痛风炎症发作过程中发挥着重要作用。有学者^[8]用尿酸钠晶体作用于缺失了 NALP3 和 ASC 的鼠巨噬细胞,同样也证实了 NALP3 炎

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.11.052

基金项目:上海市卫生系统优秀学科带头人新百人计划基金(XBR2011006);上海市科委基础研究重大课题基金(11DJ1400103)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院风湿免疫科

通讯作者:赵东宝,Email:dongbaozhao@163.com

性体是尿酸钠结晶诱发的炎症反应所必需的。值得注意的是,这些小鼠在腹膜注射 MSU 晶体后,也表现出中性粒细胞募集受损。这些证明 NALP3 炎性体能够在已知的痛风诱因和痛风急性发作典型的病理生理标志之间发挥很好的联系作用。

(二) IL-1 β 产生和成熟

IL-1 β 以非活性的前体形式由免疫细胞产生,包括巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞,是一个潜在的促炎性细胞因子,具有多种功能,是一个重要的炎症反应调节器,与细胞增殖、分化和凋亡相关。IL-1 β 合成和释放过程被严格控制,免疫刺激后,首先 IL-1 β 通过 MyD88 依赖 TLR 和 MyD88 依赖 IL-1 受体信号途径产生,以无活性的前体(pro-IL-1 β)形式存在。随后,细胞质中累积的 pro-IL-1 β 被活化的 Caspase-1 分解,导致成熟的 IL-1 β 产生并释放至胞外,可作为固有免疫反应的开始,可见 IL-1 β 生物活性直接依赖于 Caspase-1 的活化。

(三) Caspase-1 的活化和炎性体

Caspase-1 是半胱天冬酶之一,小鼠缺乏 Caspase-1 不能产生成熟的 IL-1 β ,Caspase-1 的活化同样受到严格的调控,需要在炎性体平台募集酶的二聚体。简单地说,炎性体是由 Caspase-1 前体、细胞质蛋白 ASC(含有 Caspase 相关募集区域)和细胞内受体包含 N 端一个 pyrin 区域,中央核苷酸结合结构域和 C-末端 LRR 组成。活化的 NALP3 炎性体能够导致 Caspase-1 活化,促进 pro-IL-1 β 转化为成熟的 IL-1 β 并分泌。活化的 IL-1 β 通过激活 IL-1 受体使趋化因子和其他炎症调节因子发挥作用,导致中性粒细胞进入关节等尿酸盐沉积部位,并能使机体产生发热反应,导致痛风的炎症产生和进展,可激活破骨细胞并使其分化,还能作用于神经元,触发机体对炎症所致疼痛的过度敏感。

(四) NALP3 炎性体与肝、肾疾病

随着痛风发病率的升高,相关伴发疾病如脂肪肝、肾脏病、糖尿病等也呈上升趋势。研究小鼠非酒精性脂肪性肝炎(NASH)模型发现 NALP3 炎性体参与胰岛素抵抗的形成,可能是影响 NASH 发生和发展的重要因素。Kamari 等^[9]研究 IL-1 α/β 基因敲除小鼠显示,在饮食诱导的野生型小鼠 NASH 中,两种基因敲除能显著减少单纯脂肪变向脂肪性肝炎的转变,因而靶向干扰肝脏 IL-1 α/β 可抑制向 NASH 的进展。Vilaysane 等^[10]分析显示肾脏疾病患者肾活检组织中 NALP3 mRNA 的表达量均显著增加,且与血肌酐水平及肾功能的恶化程度呈正相关,这提示 NALP3 炎性体在急慢性肾脏疾病中作用显著。Iyer 等^[11]研究肾脏缺血-再灌注模型发现肾脏缺血-再灌注损伤中 NALP3 基因表达显著上调,而 NALP3 $^{-/-}$ 小鼠肾组织中中性粒细胞的浸润程度和肾功能损害程度显著减轻,死亡率也显著降低。这说明 NALP3 炎性体诱导了缺血急性肾小管坏死中的急性炎症反应,抑制 NALP3 炎性体的活性可减少肾脏组织损伤和急性炎症反应。Hao 等^[12]研究肾脏缺血-再灌注模型推测 NALP3 炎性体可能通过活化 MAPK 信号途径介导肾损伤,但详细机制目前还不清楚。这些疾病的发生均与 NALP3 mRNA 和 IL-1 β 等炎性因子的表达增加相关,促进 IL-1 β 、IL-18、IL-33 等主要促炎细胞因子产生及分泌的关键步骤依赖于 Caspase-1 的活化,而 Caspase-1 的活性又受到 NALP3 炎性体的调控。调控 NALP3 炎性体表达水平,可能成为其治疗的新思路。

四、炎性体活化与调控的机制

(一) 炎性体活化

最近研究提示 P2X7 受体介导的 K⁺ 外流在 NALP3 活化中发挥核心作用,阻断 K⁺ 外流可阻止 NALP3 对所有已知活化剂的反应^[13]。其次,通过 MSU 晶体和微粒子活化 NALP3 炎性体

似乎与吞噬途径相关,粒子摄入能使吞噬溶酶体破裂,随后释放组织蛋白酶 B^[14]。最后,活性氧(ROS)的产生在炎性体活化中也非常重要。无论是通过药物抑制 NADPH 氧化酶或 siRNA 介导的抑制其产生都能阻止 MSU 晶体刺激的 IL-1 β 释放。Tschopp 等^[15]研究同样证实,ROS 的抑制剂 N-乙酰半胱氨酸可以阻断 NALP3 炎性体的活化,明显抑制 IL-1 β 的活化成熟。然而,ROS 的作用还不清楚,进一步研究提示增加 ROS 的产生实际上可能抑制 Caspase-1 的活化^[16]。可以假设激动剂和细胞类型不同,炎性体激活所涉及的机制可能不同。最近的一项研究支持这一假设,在体外单核细胞培养仅需要一个外源性刺激就可导致 IL-1 β 释放。而在巨噬细胞培养中,产生 IL-1 β 需要两个不同的刺激^[17]。这是由于单核细胞存在活化 Caspase-1 酶的同时,又具有释放可作为第二刺激内源性 ATP 的能力。相反的,巨噬细胞不仅需要第一信号诱导转录和翻译,而且还需要不同的第二信号,才能激活 Caspase-1,最终导致 IL-1 的产生和释放。

AIM2 炎性体是最近发现的另一个以 ASC 依赖的、NLR 独立的方式活化 IL-1 和 Caspase-1 的炎性体。它包含一个 HIN200 区域,能结合细胞质 DNA,包括细菌、病毒和哺乳动物起端,导致 ASC 适配器蛋白募集至它的 PYD 上,随后活化 Caspase-1 和 IL-1^[18-19]。

(二) 炎性体的调控

NALP3 中 LRR 区域与 TLR 中相似,也被认为是配体敏感基序。在这个概念中,NALP3 以无活性的形式存在细胞质中,当与激动剂结合后变成有活性的,这可能由于分子构象重排,暴露了中央的核苷酸结合或寡聚结构域和随后的 N 末端效应结构域(pyrin 结合域),因此 NALP3 每个激活剂能够直接或间接连接 NALP3 的 LRR 区域,导致 NALP3 构象变化和随后结构重组。这些数据均提示 NALP3 可能通过 LRR 区域直接与活化剂作用。

NALP3 的 LRR 区域结合伴侣热休克蛋白 90(HSP90)和泛素连接酶相关蛋白(SGT1)是维持 NALP3 炎性体功能所必需的,HSP90 和 SGT1 维持 NALP3 处于无活性状态,阻断 NALP3 蛋白寡聚体的形成,一旦检测到活化信号就会从 NALP3 上分离,使其发生构象改变而被活化,暴露出 NACHT 结构域,通过磷酸腺苷(ATP)聚合形成高度有序的 NALP3 蛋白寡聚体,随之通过 PYD 效应结构域募集 ASC 和 CARD-Caspase-1 形成炎性体 NALP3 复合物,ASC 与 Caspase-1 的 CARD 相互作用形成活化的 ICE,作用于 IL-1 β 前体,释放出有活性的 IL-1 β 。一旦缺乏 HSP90,NALP3 变得不稳定且被蛋白酶体降解。如果 NALP3 缺乏 LRR 区域,HSP90 和 SGT1 就不能与 NALP3 相互作用,因此,NALP3 如果没有 LRR 区域将不稳定且不能对活化信号形成炎性体复合物。

为了确定是否 NALP3 炎性体 LRR 区域为 MSU 晶体诱导的炎症所需要的,使用一种新的重组 LRR 区域缺乏的小鼠,研究发现这些小鼠骨髓源性巨噬细胞在 MSU 晶体刺激下不能活化 Caspase-1 和促进 IL-1 β 释放。说明 NALP3 的 LRR 区域在 MSU 晶体诱导的炎症反应中是必需的。然而是否 MSU 晶体直接与 NALP3 的 LRR 区域作用目前仍不清楚^[20]。

NALP3 蛋白突变与一些遗传性自身免疫性综合征相关,如家族性冷荨麻疹或家族性寒冷型自身炎症综合征、Muckle-well 综合征(MWS)和慢性婴儿期皮肤关节综合征(CINCA),这些是由于自发 IL-1 β 产生,可能由于异常蛋白增加了 NALP3 炎性体的活化^[21]。

五、靶向 IL-1 β 治疗痛风

NALP3 炎性体参与痛风发病的机制也在痛风的治疗中得到

体现,药理实验发现,治疗痛风的秋水仙碱在微摩尔水平,可以抑制尿酸钠晶体诱导的 THP1 细胞的 NALP3 炎性体活化,从而抑制 Caspase-1 激活,使 IL-1 β 的产生和释放减少^[22]。提示秋水仙碱的治疗作用可能部分由于抑制 NALP3 炎性体活化。有学者^[23]发现使用 IL-1 受体抑制剂阿那白滞素(anakinra)或抗 IL-1 受体抑制性抗体能减轻小鼠模型尿酸结晶诱导的腹膜炎,并通过临床验证,选择 10 例对常规治疗方法如非甾体抗炎药(NSAID)、秋水仙碱和皮质类固醇等使用无效或者已经存在严重的药物不良反应的急性痛风患者,均接受阿那白滞素治疗,所有患者对药物反应迅速,治疗过程中无一例不良事件发生。Terkehaub 等^[24]使用另一种 IL-1 受体拮抗剂 Rilonacept 治疗了 10 例慢性活动性痛风性关节炎,疼痛缓解迅速、持续,这些均说明 IL-1 受体拮抗剂能很好改善难治性或慢性痛风患者临床症状。不仅如此,在降尿酸过程中因尿酸水平波动诱发痛风急性发作也是我们临床治疗中遇到的难题, Schumacher 等^[25]和 Schlesinger 等^[26]研究发现 IL-1 抑制剂还能有效预防降尿酸过程中的急性发作。

六、结论与展望

综上所述,NALP3 作为胞内模式识别受体,在激发和调节长期免疫及炎症反应中起着重要的调控作用。NALP3 炎性体不仅与痛风发病密切相关,其活化通路中相关抑制剂在难治性痛风的动物和人类试验中提示痛风新的治疗靶点,但目前现有的治疗研究仅限于 Caspase-1 及 IL-1 途径,NALP3 炎性体中相关途径如 ASC、NALP3 研究较少,而 NALP3 炎性体的激活途径及其与相关疾病关系的研究目前尚未深入,进一步深入研究其激活机制和调控机制,将为治疗相关炎症性疾病提供新的思路与治疗手段。有助于阐明痛风炎症机制、寻找新的药物靶点以及开发新型药物,对痛风的治疗、预防都具有重要意义。

参考文献

- [1] 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: 857-865.
- [2] Carneiro LA, Magalhaes JG, Tattoli I, et al. Nod-like proteins in inflammation and disease. *J Pathol*, 2008, 214: 136-148.
- [3] Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, et al. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 615-622.
- [4] Eisenbarth SC, Flavell RA. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome. *EMBO Mol Med*, 2009, 1: 92-98.
- [5] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006, 440: 237-241.
- [6] Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res*, 2011, 4: 39-49.
- [7] Sidiropoulos PI, Goulielmos G, Voloudakis GK, et al. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67: 1382-1389.
- [8] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 2008, 9: 847-856.
- [9] Kamari Y, Shaish A, Vax E, et al. Lack of interleukin 1 alpha or interleukin-1 beta inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *J Hepatol*, 2011, 55: 1086-1094.
- [10] Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 1732-1744.
- [11] Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 20388-20393.
- [12] Hao JL, Li YF, Li RS. A novel mechanism of NALP3 inducing ischemia reperfusion injury by activating MAPK pathway in acute renal failure. *Med Hypotheses*, 2013, 80: 463-465.
- [13] Franchi L, Kanneganti TD, Dubyak GR, et al. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem*, 2007, 282: 18810-18818.
- [14] Chu SC, Yang SF, Tzang BS, et al. Cathepsin B and cystatin C play an inflammatory role in gouty arthritis of the knee. *Clin Chim Acta*, 2010, 411: 1788-1792.
- [15] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signaling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 210-215.
- [16] Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nat Immunol*, 2008, 9: 866-872.
- [17] Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*, 2009, 113: 2324-2335.
- [18] Roberts TL, Idris A, Dunn JA, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*, 2009, 323: 1057-1060.
- [19] Burekstummer T, Baumann C, Bluml S, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*, 2009, 10: 266-272.
- [20] Alexander S. Developments in the scientific and clinical understanding of gout. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10: 221.
- [21] Liu-Bryan R. Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88: 20-23.
- [22] Nuki G. Colchicine: its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Curr Rheumatol Rep*, 2008, 10: 218-227.
- [23] So A, De Smedt T, Revaz S, et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9: R28.
- [24] Terkeltaub R, Sundry JS, Schumacher HR, et al. The interleukin 1 inhibitor rilonacept in treatment of chronic gouty arthritis: results of a placebo-controlled, monosequence crossover, non-randomised, single-blind pilot study. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68: 1613-1617.
- [25] Schumacher HR Jr, Sundry JS, Terkeltaub R, et al. Rilonacept (interleukin-1 trap) in the prevention of acute gout flares during initiation of urate-lowering therapy. *Arthritis Rheum*, 2012, 64: 876-884.
- [26] Schlesinger N, Mysler E, Lin HY, et al. Canakinumab reduces the risk of acute gouty arthritis flares during initiation of allopurinol treatment: results of a double-blind, randomised study. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70: 1264-1271.

(收稿日期:2013-04-23)

(本文编辑: 张志巍)