

综述

NLRP3 炎症小体在创伤性脊髓损伤中作用的研究进展

Current progress of NLRP3 inflammasome in traumatic spinal cord injury

高书涛, 苟传辉, 盛伟斌

(新疆医科大学第一附属医院脊柱外科 830054 乌鲁木齐市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.11.14

中图分类号: R683.2, R363.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2019)-11-1042-04

创伤性脊髓损伤(trumatic spinal cord injury, TSCI)是脊柱外科常见疾病,可导致损伤节段以下的感觉、运动功能丧失和大小便功能障碍,致残率极高。TSCI 的发生率呈逐年升高趋势,并且发生人群趋于年轻化,给家庭和社会带来了沉重的负担^[1]。按照病理生理变化过程,TSCI 可分为原发性损伤和继发性损伤。炎症反应在继发性损伤过程中发挥着关键作用,如果得不到有效控制,会导致损伤之后的瘫痪平面扩展到更高节段^[2,3]。最新研究发现炎症反应的启动需要一类称为炎症小体(inflammasome)的蛋白复合体参与^[4]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-, leucine-rich repeat- and pyrin domain-containing 3, NLRP3)炎症小体是目前研究最多的一种炎症小体,其广泛分布在中枢神经系统^[5,6]。越来越多的研究发现脊髓损伤后 NLRP3 炎症小体的表达水平显著上调,抑制 NLRP3 炎症小体能够改善 TSCI 后的运动功能^[7-9]。笔者就 NLRP3 炎症小体及其在 TSCI 中的作用和相关分子机制进行综述。

1 NLRP3 炎症小体的组成结构

天然免疫系统作为机体免疫反应的第一道防线,当机体遭受内外源性侵害时,能够通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRRs)识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)和/或危险相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMP),从而发挥免疫调节作用^[10]。中枢神经系统的 PRRs 主要在小胶质细胞、巨噬细胞和星形胶质细胞中表达,其中定位于胞质并识别细胞内外信号的 PRRs 称为核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体(NOD-like receptors, NLRs), NLRP1、NLRP2、NLRP3 和 NOD 样受体家族 CARD 结构域包含蛋白 4(NLRC4)等都是 NLRs 家族常见的亚型^[5]。NLRP3 炎症

小体的组成主要包括三部分:NLRP3、富含半胱氨酸天冬酶募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)^[11]和半胱氨酸蛋白酶 1 前体(pro-cysteiny aspartate specific proteinase 1, pro-caspase-1)^[12]。

2 NLRP3 炎症小体的活化机制

NLRP3 炎症小体的激活需要两条信号通路的共同参与^[5]。第一条信号通路是细胞膜表面的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs),识别 DAMP 和/或 PAMP,引发核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF-κB)激活。激活后的 NF-κB 促进下游的 NLRP3、ASC、pro-caspase-1、白介素前体蛋白-1β(pro-interleukin-1β, pro-IL-1β)和 pro-IL-18 等转录,为 NLRP3 炎症小体的活化做准备。第二条信号通路是感受到 DAMP 或 PAMP 刺激的 NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 迅速发生寡聚化,组装为成熟的 NLRP3-ASC-pro-caspase-1 蛋白复合体,即 NLRP3 炎症小体^[13]。NLRP3 炎症小体为 pro-caspase-1 自我催化水解提供了平台,使后者转变为具有生物活性的 caspase-1。成熟的 caspase-1 进一步切割 pro-IL-1β 和 pro-IL-18,将其转变为具有生物活性的 IL-1β 和 IL-18,并释放到细胞外的组织中,参与后续的炎症瀑布反应。强烈的炎症反应会导致脊髓中的神经元和少突胶质细胞死亡。因为中枢神经系统的多种细胞都表达 IL-1β 和 IL-18 的受体,所以对 NLRP3 炎症小体介导的炎症信号通路尤为敏感^[14,15]。

3 NLRP3 炎症小体与 TSCI

3.1 体外实验研究

NLRP3 炎症小体的激活模式很多,目前公认的三种模式包括细胞膜离子流的产生^[16]、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生^[17]和溶酶体的破裂^[18]。K⁺外流、Cl⁻外流、Ca²⁺内流和 Na⁺内流都参与 NLRP3 炎症小体的激活,其中 K⁺外流占主导作用。

小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞,而且对神经元起着支持、保护和修复等作用^[19]。在脊髓损伤过程中的神经炎症反应主要由激活的小胶质细胞介导^[20]。NLRP3

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金资助项目(编号:81960235)

第一作者简介:男(1989-),博士在读,研究方向:脊柱脊髓损伤
电话:(0991)4362829 E-mail:gaoshutao@126.com

通讯作者:盛伟斌 E-mail:wbsheng@vip.sina.com

炎症小体细胞模型的建立最经典的方式是先内毒素对细胞进行一段时间的预刺激,之后再加入特定浓度的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)共同刺激细胞,这种方式由 Coll 等^[21]最先报道,之后被广泛应用于不同种类细胞 NLRP3 炎症小体激活模型的制备。Lin 等^[28]利用 10ng/ml 的内毒素对大鼠来源的小胶质细胞进行了 6h 的预刺激,紧接着加入 5mM 的 ATP 刺激 0.5h,成功制备了 NLRP3 炎症小体激活模型。在使用亚甲蓝抑制 ROS 后,NLRP3 炎症小体的表达水平显著性降低,表明 ROS 信号通路处于 NLRP3 炎症小体的上游。使用 ROS 特异性阻断剂,或许能够从源头减轻后续的炎症反应。

Zheng 等^[22]尝试利用无糖 DMEM 培养基、5%CO₂+0.02%O₂+94.98%N₂ 的糖氧剥夺条件培养鼠神经元 6h,体外环境中模拟 TSCI 后的神经元损伤,发现糖氧剥夺后的神经元高表达 NLRP3、IL-1 β 、caspase-1 和 IL-18,表明神经元中存在 NLRP3 信号通路介导的炎症反应;肌醇依赖酶 (inositol-requiring enzyme 1,IRE1) 是内质网应激 (endoplasmic reticulum stress,ERS) 信号通路的核心蛋白,参与神经元 NLRP3 炎症小体的激活过程,在使用外源性小分子干扰 RNA 破坏 IRE1 或者使用 IRE1 特异性阻断剂后,NLRP3 信号通路能够被阻断。然而,IRE1 是如何调控 NLRP3 炎症小体并不清楚,相关研究只停留在功能层面,还需要进一步探索其中的机制。

Yanagisawa 等^[23]发现 ERS 信号通路处于 NLRP3 炎症小体的上游,ERS 能够直接调控 NLRP3 炎症小体的激活,激活的 NLRP3 炎症小体为 caspase-2 的加工成熟提供平台,成熟的 caspase-2 会导致线粒体功能紊乱,并释放出内源性的 DAMP,而后者又会进一步激活炎症小体;通过免疫荧光技术区分不同的细胞类型,还观察到 NLRP3 炎症小体在少突胶质前体细胞中的表达较高,而且 NLRP3 炎症小体信号通路更容易介导少突胶质细胞的死亡,但星形胶质细胞却能够对抗 NLRP3 炎症小体介导的细胞死亡。这可能是由于星形胶质细胞在逃避死亡后,能够参与到胶质瘢痕的形成过程,从而限制发炎症反应的进一步加剧^[24]。Yanagisawa 等^[23]的研究提示,可以通过间接抑制 ERS 信号通路,控制 NLRP3 炎症小体介导的少突胶质细胞死亡,从而改善 SCI。

Lv 等^[25]单纯使用 100mg/ml 的内毒素刺激 BV-2 细胞 12h,成功激活了 NLRP3 炎症小体,白藜芦醇能够抑制 NF- κ B 信号通路下调 NLRP3 炎症小体的表达。Xu 等^[26]使用同样的方法刺激人神经母细胞瘤细胞 (human neuroblastoma SK-N-SH-SY5Y,SH-SY5Y),也制备了 NLRP3 炎症小体激活模型,褪黑素能够通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活减少 SH-SY5Y 细胞的死亡。Meng 等^[27]对 SCI 后的大鼠脊髓神经元进行原代培养,发现 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达水平显著高于假手术组来源的神经元,过氧化物酶体增殖体激活受体 γ 能够逆转 NLRP3 炎症小体的表达,但是对 NLRP3 炎症小体上游的转录因子 NF-

κ B 并没有抑制作用。

3.2 体内实验研究

Jiang 等^[9]检测了小鼠 TSCI 后不同时间点 NLRP3 炎症小体主要成分 mRNA 和蛋白表达水平,发现 mRNA 在 TSCI 后的 6h 内开始升高,并且在第 3 天达到峰值;NLRP3 和 caspase-1 蛋白水平的表达在 TSCI 后 3d 开始显著升高,但是 pro-caspase-1 并没有显著变化;NLRP3 抑制剂 BAY11-7082 和 A438079 的使用不仅可以促进脊髓组织中的小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转化,而且能减轻中性粒细胞向损伤部位的渗出,从而改善神经功能。但是其并没有进一步研究 NLRP3 炎症小体的激活和小胶质细胞极化之间的关系。考虑到小胶质细胞的极化在 SCI 后的炎症反应过程中的重要作用,以后的研究应当进一步探究 NLRP3 炎症小体激活和小胶质细胞极化之间的分子机制。Lin 等^[28]的大鼠 TSCI 模型研究发现 NLRP1 的 mRNA 水平和蛋白水平在损伤发生后 6h 会显著升高,但是 NLRP3 在损伤后的 24h 内并没有显著变化。嘌呤接受体 P2X4 能够调控炎症小体的激活,De Rivero 等^[29]发现 P2X4 基因敲除小鼠在 SCI 后,caspase-1 和 IL-1 β 的表达水平低于野生型小鼠,病灶部位的中性粒细胞渗出、单核细胞来源的 M1 型巨噬细胞数量也较少,神经功能显著优于野生型小鼠。

Schwann 细胞移植修复 SCI 的研究已经广泛开展,也取得了一定的成果。文献报道 Schwann 细胞能够下调神经炎症反应,改善局部微环境^[30],这也是其治疗 SCI 的理论基础之一。然而,Schwann 细胞是如何下调神经炎症反应并不清楚。Mousavi 等^[31]发现在 SCI 后 21d,NLRP3 炎症小体主要成分 NLRP3、ASC 和 caspase-1 无论是 mRNA 水平还是蛋白水平,表达量都显著高于假手术组,Schwann 细胞移植能够显著逆转 NLRP3 炎症小体主要成分的表达水平;此外,Schwann 细胞还能显著下调 NLRP3 炎症小体的促炎因子肿瘤坏死因子- α 和 IL-1 β 的表达,值得注意的是,在接受 Schwann 细胞移植后,虽然 IL-18 在 mRNA 水平的表达显著下降,但是蛋白水平的表达并没有发生显著变化,这可能和 IL-18 转录后调控相关。

Zheng 等^[22]通过使用 30g 力量的血管夹持续夹持大鼠 T9 脊髓 1min 的方法制备了 SCI 模型,损伤后脊髓组织中 NLRP3、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18mRNA 表达呈现升高趋势,在第 3 天达到峰值,之后逐渐下降;通过免疫荧光双标技术,发现 SCI 后神经元细胞的 caspase-1 表达水平显著升高,表明神经元细胞内存在 NLRP3 炎症小体的激活过程。

Zendedel 等^[32]利用免疫组织化学和免疫荧光技术对 TSCI 后的组织切片进行染色,发现 NLRP3 和 ASC 会同时在激活的小胶质细胞中表达;NLRP3 虽然在神经元中也有表达,但是很少出现和 ASC 的共表达,表明是小胶质细胞而非神经元更多地参与 NLRP3 炎症小体的激活和炎症反应过程。基质细胞衍生因子- α 和雌激素能够通过抑制炎症小体的表达显著改善 TSCI 后的神经功能^[7,32]。Xu 等^[33]发

现 miR-34c 能够和 NLRP3 基因的 3'端非编码区结合,下调 TSCI 后炎症小体的表达。将携带 miR-34c 的慢病毒注射到小鼠蛛网膜下腔后,能够显著降低小胶质细胞、神经元和星形胶质细胞中 NLRP3 的表达,从而减轻神经炎症反应和 TSCI 后的神经疼痛。此外,具有神经保护功能的药物,如 Rho 激酶抑制剂^[34]、多巴胺 D1 受体激动剂^[35]、褪黑素^[26]等也被报道能够作用于 NLRP3 炎症小体信号通路来改善 TSCI 后的神经功能。但是目前的研究还停留在细胞和动物水平,并且处在功能研究层面,仍需要进一步的机制研究。

4 总结与展望

TSCI 后的炎症反应是一个复杂的过程,现有研究表明,NLRP3 炎症小体在炎症反应的启动和发生发展过程中发挥关键作用。通过调控 NLRP3 炎症小体或许能够为 TSCI 的治疗提供新的靶点。然而,目前关于炎症小体的研究仍然存在一些需要解决的问题。第一,关于 NLRP3 炎症小体主要在哪些类型的细胞中发挥作用仍然没有定论,有的研究认为 NLRP3 主要在小胶质细胞中表达,而另外一些研究则认为 NLRP3 主要在神经元、少突胶质前体细胞和星形胶质细胞中发挥作用。这可能是由于不同研究检测的时间不同,而不同类型的细胞中 NLRP3 炎症小体激活的时间存在差异。第二,当前的研究主要集中在 NLRP3 炎症小体,忽视了其他种类的炎症小体在 TSCI 后的作用。以后的研究应当重视其他种类的炎症小体,进一步探索 TSCI 过程中不同炎症小体之间的相互作用。第三,尽管很多基础研究表明 NLRP3 炎症小体对 TSCI 至关重要,但是 NLRP3 炎症小体在不同种类的细胞中是如何发挥作用的仍有待研究。第四,目前以 NLRP3 炎症小体为靶点的治疗药物多集中在间接调控其下游的 IL-1 β 。尽管使用 IL-1 β 拮抗剂能够高效抑制炎症反应,但是也会对机体带来不良后果。第五,关于 NLRP3 炎症小体的研究结果主要建立在细胞及动物模型的基础上,由于人类和啮齿类动物的 NLRP3 炎症小体存在一定的差异,实验条件下并不能完全模拟人体内的病理生理变化过程,很有必要将现有的研究结果在临床工作中进一步验证。第六,目前关于 NLRP3 炎症小体在 SCI 中的研究多为简单的表型实验,其在 SCI 中的具体激活方式和作用机制缺乏高质量文献的支持。NLRP3 炎症小体激活过程中存在大量未知机制,并且与其他类型的炎性小体及其他信号通路可能存在交联反应,仍需要进一步的探索。

鉴于 NLRP3 炎症小体在 TSCI 中的重要作用,以 NLRP3 炎症小体为作用靶点或许能为 TSCI 的治疗提供新的思路。然而,尽管大量关于 NLRP3 炎症小体的基础研究被开展,很多药物被证明能够抑制 NLRP3 炎症小体的激活,但是截至目前并没有找到其特异性抑制剂。MCC950 是已知的最强有效的 NLRP3 抑制剂,可以尝试将其应用在 TSCI 的治疗上^[36]。由于 NLRP3 炎症小体主要由

NLRP3、ASC 和 pro-caspase-1 三种分子组成,研究人员可以尝试通过寻找这三种成分的特异性阻断剂来抑制 NLRP3 炎症小体的激活。

5 参考文献

1. Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate[J]. Spinal Cord, 2014, 52(2): 110-116.
2. Silva NA, Sousa N, Reis RL, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury[J]. Prog Neurobiol, 2014, 114: 25-57.
3. Orr MB, Gensel JC. Spinal cord injury scarring and inflammation: therapies targeting glial and inflammatory responses [J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(3): 541-553.
4. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes[J]. Cell, 2010, 140(6): 821-832.
5. Walsh JG, Muruve DA, Power C. Inflammasomes in the CNS [J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(2): 84-97.
6. Mamik MK, Power C. Inflammasomes in neurological diseases: emerging pathogenic and therapeutic concepts[J]. Brain, 2017, 140(9): 2273-2285.
7. Zendedel A, Monnik F, Hassanzadeh G, et al. Estrogen attenuates local inflammasome expression and activation after spinal cord injury [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(2): 1364-1375.
8. Lin ZH, Wang SY, Chen LL, et al. Methylene blue mitigates acute neuroinflammation after spinal cord injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation in microglia[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11: 391.
9. Jiang W, Li M, He F, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome to attenuate spinal cord injury in mice [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 207.
10. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases[J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29: 707-735.
11. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA[J]. Nature, 2009, 458(7237): 509-513.
12. Faustini B, Lartigue L, Bruey JM, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation[J]. Mol Cell, 2007, 25(5): 713-724.
13. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger[J]. Science, 2010, 327(5963): 296-300.
14. Mortezaee K, Khanlarkhani N, Beyer C, et al. Inflammasome: its role in traumatic brain and spinal cord injury[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(7): 5160-5169.
15. Putatunda R, Bethea JR, Hu WH. Potential immunotherapies for traumatic brain and spinal cord injury [J]. Chin J Traumatol, 2018, 21(3): 125-136.
16. Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, et al. K⁺ ef

- flux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter[J]. *Immunity*, 2013, 38(6): 1142–1153.
17. Wei P, Yang F, Zheng Q, et al. The potential role of the NLRP3 inflammasome activation as a link between mitochondria ROS generation and neuroinflammation in postoperative cognitive dysfunction[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 73.
 18. Weber K, Schilling JD. Lysosomes integrate metabolic-inflammatory cross-talk in primary macrophage inflammasome activation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(13): 9158–9171.
 19. Freeman L, Guo H. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(5): 1351–1370.
 20. David S, Greenhalgh AD, Kroner A. Macrophage and microglial plasticity in the injured spinal cord[J]. *Neuroscience*, 2015, 307: 311–318.
 21. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248–255.
 22. Zheng G, Zhan Y, Wang H, et al. Carbon monoxide releasing molecule-3 alleviates neuron death after spinal cord injury via inflammasome regulation[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 643–654.
 23. Yanagisawa S, Katoh H, Imai T, et al. The relationship between inflammasomes and the endoplasmic reticulum stress response in the injured spinal cord[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 705: 54–59.
 24. Leal-Filho MB. Spinal cord injury: from inflammation to glial scar[J]. *Surg Neurol Int*, 2011, 2: 112.
 25. Lv R, Du L, Liu X, et al. Polydatin alleviates traumatic spinal cord injury by reducing microglial inflammation via regulation of iNOS and NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 70: 28–36.
 26. Xu G, Shi D, Zhi Z, et al. Melatonin ameliorates spinal cord injury by suppressing the activation of inflammasomes in rats [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5183–5192.
 27. Meng QQ, Feng ZC, Zhang XL, et al. PPAR- γ activation exerts an anti-inflammatory effect by suppressing the NLRP3 inflammasome in spinal cord-derived neurons[J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 6386729.
 28. Lin WP, Xiong GP, Lin Q, et al. Heme oxygenase-1 promotes neuron survival through down-regulation of neuronal NLRP1 expression after spinal cord injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 52.
 29. De Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G, et al. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(9): 3058–3066.
 30. Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, et al. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN- γ , IL-10 and TNF- α mRNA[J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 102(1): 17–25.
 31. Mousavi M, Hedayatpour A, Mortezaee K, et al. Schwann cell transplantation exerts neuroprotective roles in rat model of spinal cord injury by combating inflammasome activation and improving motor recovery and remyelination [J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(4): 1117–1130.
 32. Zendedel A, Johann S, Mehrabi S, et al. Activation and regulation of NLRP3 inflammasome by intrathecal application of SDF-1 α in a spinal cord injury model[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3063–3075.
 33. Xu L, Wang Q, Jiang W, et al. MiR-34c ameliorates neuropathic pain by targeting NLRP3 in a mouse model of chronic constriction injury[J]. *Neuroscience*, 2019, 399: 125–134.
 34. Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, et al. Effect of fasudil, a selective inhibitor of Rho kinase activity, in the secondary injury associated with the experimental model of spinal cord trauma[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 343(1): 21–33.
 35. Jiang W, Li M, He F, et al. Dopamine D1 receptor agonist A-68930 inhibits NLRP3 inflammasome activation and protects rats from spinal cord injury-induced acute lung injury[J]. *Spinal Cord*, 2016, 54(11): 951–956.
 36. Tapia-Abellan A, Angosto-Bazarra D, Martinez-Banaclocha H, et al. MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6): 560–564.

(收稿日期:2019-05-20 末次修回日期:2019-09-23)

(本文编辑 卢庆霞)