

NLRP3 炎性小体在蛛网膜下腔出血中的研究进展

陈陶 唐晓平

637000 南充, 川北医学院附属医院神经外科

通信作者: 唐晓平, Email: Txping1971@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.06.017

【摘要】 蛛网膜下腔出血(SAH)是一种急性脑血管疾病,近年来炎性反应被认为在SAH及其并发症中起着重要作用,而NLRP3炎性小体在炎性反应中起关键作用,但其具体作用机制有待进一步阐明。现针对NLRP3炎性小体在SAH中的作用及相关研究作一综述,旨在为SAH的临床研究和治疗策略提供相关线索。

【关键词】 蛛网膜下腔出血; NLRP3炎性小体; 炎性反应

基金项目: 川北医学院校级科研发展计划项目(CBY17-A-ZD09)

Research progress of NLRP3 inflammasome in subarachnoid hemorrhage Chen Tao, Tang Xiaoping
Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China
Corresponding author: Tang Xiaoping, Email: Txping1971@163.com

【Abstract】 Subarachnoid hemorrhage (SAH) is an acute cerebrovascular disease. In recent years, inflammatory responses have been considered to play an important role in SAH and its complications. The NLRP3 inflammasome plays a key role in the inflammatory response with its mechanism yet to be specified. This review focuses on the role and related research of NLRP3 inflammasome in SAH, aiming to provide references for clinical studies and treatment strategies of SAH.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage; NLRP3 inflammasome; Inflammation

Fund program: North Sichuan Medical College Scientific Research Development Program (CBY17-A-ZD09)

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是一种具有高死亡率和高致残率的急性脑血管疾病,约占卒中的5%^[1]。SAH具有复杂的病理生理学,且涉及多种机制(如颅内压增高、脑血流量减少、炎性反应的激活、氧化应激反应、细胞凋亡等)^[2],最终可导致SAH后早期脑损伤(early brain injury, EBI)、脑血管痉挛(cerebrovascular spasm, CVS)、脑积水(hydrocephalus)和迟发性脑缺血(delayed cerebral ischemia, DCI)等并发症的发生^[3-5]。近年来,炎性反应被认为在SAH及其并发症中起着重要作用,并且其程度与患者的预后密切相关^[6]。而NLRP3炎性小体在炎性反应中起关键作用,NLRP3炎性小体在SAH早期被激活后,介导caspase-1的激活,并释放IL-1 β 和IL-18,由此引发炎性反应^[7],现就NLRP3炎性小体在SAH中的研究进展进行阐述。

一、NLRP3炎性小体概述

先天性免疫系统作为机体内一种重要的自身防御系统,在外源性或内源性刺激物刺激机体后,

通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR)识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)或损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP),活化下游信号通路,从而引发机体全身或局部炎性反应,进而释放介导细胞因子^[8]。根据识别受体的不同,炎性体可大致分为两类:核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide binding oligomerization domain, NOD)样家族和PYHIN(Pyrin and HIN domain-containing)蛋白家族;前者包括NLRP1、NLRP3、NLRP6、NLRP7等,后者包括黑素瘤缺乏因子-2(absent in melanoma-2, AIM2)等^[9]。

NLRP3炎性小体是NOD样家族中的典型成员,也是目前研究最广泛的炎性小体。它主要由NLRP3(又称cryopyrin或NALP3)、含有半胱天冬酶募集结构域凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis associated speck-like protein containing a CARD domain, ASC)和半胱天冬氨酸酶-1前体(pro-caspase-1)组成^[10-12]。其中,

NLRP3为其核心部分,主要包括三部分:C-末端为富含亮氨酸重复序列(leucine-rich-repeat domain, LRR),可参与识别危险信号;中间为核苷酸结合寡聚化结构域(nucleoside triphosphatase domain, NACTH或NOD),可介导蛋白寡聚化,并参与炎性小体的形成;N-末端包括热蛋白结构域(pyrin domain, PYD)、胱天蛋白酶募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)等,参与炎性小体激活信号传导过程。ASC是细胞内一类重要的衔接蛋白,包含两个重要的结构域即PYD和CARD。当外源性或内源性刺激物激活NLRP3后,NLRP3通过PYD介导同型蛋白之间的相互作用与ASC结合,ASC则通过CARD结构域募集pro-caspase-1,最终形成NLRP3炎性小体,并激活caspase-1,促进IL-1 β 、IL-18前体(即pro-IL-1 β 、pro-IL-18)的成熟与释放,参与炎症反应,并促进细胞凋亡^[7,13]。

NLRP3炎性小体在众多炎症性疾病的发生及发展过程中担当重要角色,如口腔疾病、2型糖尿病、动脉粥样硬化、神经退行性疾病(如阿尔茨海默病等)、创伤性脑损伤、脑炎、脑卒中等^[14-15]。近年来,众多研究表明NLRP3炎性小体参与到SAH后的炎症反应中,明确NLRP3炎性小体在SAH后炎症反应中的具体机制有重要意义。

二、NLRP3炎性小体的活化机制

目前研究表明,NLRP3炎性小体的激活包括两个步骤。第一步,机体通过PRR识别外源性或内源性刺激物后触发启动信号,并引发Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)/核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号传导途径的激活,促进NLRP3及其下游pro-IL-1 β 、pro-IL-18的表达增加;第二步,NLRP3炎性小体的组装完成,触发pro-caspase-1向有活性的caspase-1转化,并释放成熟的IL-1 β 、IL-18,参与炎症反应^[16-17]。

目前NLRP3炎性小体的活化机制仍存在争议,其被公认的激活机制主要有以下3种:钾离子外流^[12]、溶酶体的破坏和组织蛋白酶的释放^[18]以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生^[19]。除上述三种主要机制外,还有其他的机制也能激活NLRP3炎性小体,如线粒体损伤后DNA或心磷脂的释放^[20]、线粒体的易位^[21]以及钙离子动员介导的线粒体损伤和功能障碍^[22]等。然而NLRP3炎性小体激活的决定性分子机制却有待进一步研究。

三、NLRP3炎性小体与蛛网膜下腔出血

SAH后数小时至数天内发生的继发性脑损伤是造成SAH不良预后的主要原因,炎症反应在其发病

机制中起重要作用。一般情况下,炎症反应可以清除SAH后机体内的死亡细胞或其他有害物质,并促进组织细胞的修复或重建;但是,过度或不受控制的炎症反应可导致SAH后细胞损伤和血脑屏障的破坏,从而引起或加重脑水肿和SAH后继发性细胞凋亡^[23]。

炎症反应包括炎症细胞的激活和促炎细胞因子的释放^[24]。SAH后免疫细胞(如单核/巨噬细胞和中性粒细胞)通过被破坏的血脑屏障进入大脑,到达受损区域后,激活大脑的常驻免疫效应细胞(如小胶质细胞等);随后活化的小胶质细胞产生,并释放多种促炎细胞因子和趋化因子,对周围神经细胞组织造成损伤,并可促进白细胞的募集,进一步加重脑损伤^[25-26]。

有研究证实,在中枢神经系统中,NLRP3主要位于小胶质细胞中,小胶质细胞中的NLRP3被激活后,形成NLRP3炎性复合体,pro-caspase-1被切割成蛋白水解亚基(caspase-1 p20和caspase-1 p10),并将pro-IL-1 β 、pro-IL-18转化为成熟的IL-1 β 、IL-18,进一步产生和释放细胞因子,引发和促进炎症反应,并诱导程序性细胞死亡^[27]。因此阐明NLRP3炎性小体在SAH后炎症反应中的分子机制对于临床研究和治疗策略有重要意义。而目前众多研究主要采用半定量PCR法检测细胞中NLRP3 mRNA表达和Western blot法检测细胞中NLRP3蛋白表达。

作为一种多蛋白复合物,NLRP3炎性小体的活化机制在SAH及其并发症的发生发展过程中尚不明确。有相关研究证明,P2X7R位于NLRP3炎性小体的上游,且P2X7R/cryopyrin炎性体信号轴可能参与SAH后的神经炎^[28]。Chen等^[28]在一项血管内穿孔大鼠SAH模型实验研究中采用Western blot法检测细胞中cryopyrin(即NLRP3)、P2X7R和IL-1 β ,结果表明P2X7R/NLRP3炎性体轴在SAH后早期显著表达,从而诱导促炎细胞因子的释放,最终导致EBI;并且研究人员发现通过施用小分子干扰RNA(siRNA)沉默的cryopyrin或P2X7R抑制P2X7R/NLRP3炎性体信号通路,可抑制caspase-1的活化及IL-1 β 与IL-18的释放,改善SAH后神经功能障碍与脑水肿。因此,P2X7R可能成为治疗SAH后继发性脑损伤的靶点。先前有研究报道,ATP与P2X7R的结合可促进钾离子的外流,导致NLRP3炎性体的组装与激活^[17];然而该文献并未发现钾离子的外排。

SAH后,线粒体的功能障碍可导致过量ROS的产生,激活TLR/NF- κ B信号传导途径,促进NLRP3的激活,从而诱导炎症反应的发生。Shao等^[26]在

一项大鼠SAH模型实验研究中采用Western blot法检测pI κ B α (磷酸化NF- κ B/P65抑制蛋白)、p65、NLRP3、ASC、caspase-1和IL-1 β ,采用RT-PCR检测IL-1 β 、TNF- α 的mRNA水平,以及通过测定ROS的内源性清除剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)以评估ROS水平。其结果表明,富含氢的盐水(HS)一方面可以通过抑制NF- κ B p65亚基易位至细胞核,并抑制其下游促细胞因子(如IL-1 β 、IL-18、TNF- α 等)的释放与NLRP3的表达;另一方面,HS可减少ROS的生成,抑制NLRP3炎性小体的激活,降低IL-1 β 和IL-18的释放,从而减轻EBI的炎性反应和细胞损伤。米诺环素^[11]和褪黑素^[15]均可通过减少ROS的生成,抑制NLRP3炎性小体的活化,减少成熟IL-1 β 及IL-18的产生,从而减轻SAH后EBI的炎性反应,并且改善预后。另外,线粒体可通过其自噬作用来抑制NLRP3炎性小体的活化。Cao等^[27]研究发现褪黑素能通过介导与线粒体自噬作用相关的蛋白表达上调,抑制NLRP3炎性小体的激活,降低促炎细胞因子的水平,从而发挥抗SAH后EBI的神经功能保护作用。Li等^[29]发现,氟西汀也可通过增强SAH后细胞的自噬作用抑制NLRP3炎性体和caspase-1的活化,减弱促炎细胞因子的表达,从而改善SAH后EBI;该研究还通过对实验大鼠在诱导SAH 1 h后腹膜注射选择性caspase-1抑制剂Ac-YVAD-CMK发现,该抑制剂能降低IL-1 β 和IL-18的表达,减轻脑水肿,改善神经功能,这表明caspase-1在NLRP3炎性体介导的炎性反应中发挥重要作用,然而其具体机制需待进一步阐明。

另有研究发现,SAH后NLRP3炎性小体的激活还可通过RIP1-RIP3-DRP1途径介导。在该途径中,丝氨酸-苏氨酸激酶RIP1(RIPK1)-RIP3(RIPK3)复合体可促进动力相关蛋白1(Dynammin-related protein 1, DRP1)激活,使线粒体发生易位,造成线粒体损伤,产生大量ROS,从而激活NLRP3炎性小体。Zhou等^[30]发现在SAH后早期应用Necrostatin-1(一种坏死性凋亡抑制剂)可抑制RIP1或RIP3、磷酸化DRP1和NLRP3炎性小体的表达;另一方面,采用线粒体分裂抑制剂(mitochondrial division inhibitor, mdivi-1)可抑制DRP1蛋白的表达,减轻线粒体的损伤和ROS的产生,抑制NLRP3炎性小体的激活,继而减轻SAH后的脑水肿和神经功能缺损。先前有研究表明NLRP3炎性小体主要在小胶质细胞上表达^[27];Zhou等^[30]研究发现RIP1、RIP3、DRP1的表达主要与小胶质细胞的活化相关,这进一步证实RIP1-RIP3-

DRP1途径可参与到SAH后NLRP3炎性小体激活中。

除此之外,最近研究还发现紫檀芪(Pterostilbene)、白藜芦醇(Resveratrol)和右美托咪定(Dexmedetomidine)等药物均可通过抑制NLRP3炎性小体的激活,来减轻SAH后脑水肿,并提高神经行为功能,但是其具体作用机制有待进一步研究^[24, 31-32]。从这些研究中可发现,在SAH后,NLRP3的激活涉及多种机制。然而,其主要的激活机制及调控机制仍需进一步研究阐明。

四、小结

SAH是严重的脑血管疾病,过度的炎性反应可加重SAH后脑损伤,而NLRP3炎性小体在炎性反应中发挥着关键作用。目前越来越多的研究关注NLRP3炎性小体在SAH中的作用,并表明其在SAH后EBI中起重要作用,且NLRP3在很多疾病当中均扮演着重要角色。阻断NLRP3炎性小体的活化有利于减轻SAH后的炎性反应,从而改善SAH后EBI及其不良预后。然而NLRP3炎性小体在SAH后EBI中的主要激活机制尚未阐明清楚。除EBI外,脑血管痉挛、脑积水与迟发性脑缺血等并发症均与SAH后不良预后相关,但是目前尚未有研究来探索NLRP3炎性小体是否参与这些并发症的发病机制以及它在其中的作用。因此,在SAH中,针对NLRP3炎性小体的研究有待进一步探索及验证,为SAH的治疗提供新的策略和理论依据。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 资料收集与整理及论文撰写为陈陶,论文修改为唐晓平

参 考 文 献

- [1] Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage[J]. Nat Rev Neurol, 2014, 10(1): 44-58. DOI: 10.1038/nrneurol.2013.246.
- [2] Yang SJ, Shao GF, Chen JL, et al. The NLRP3 Inflammasome: An Important Driver of Neuroinflammation in Hemorrhagic Stroke[J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(3): 595-603. DOI: 10.1007/s10571-017-0526-9.
- [3] van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage[J]. Lancet, 2007, 369(9558): 306-318. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60153-6.
- [4] Sun X, Ji C, Hu T, et al. Tamoxifen as an effective neuroprotectant against early brain injury and learning deficits induced by subarachnoid hemorrhage: possible involvement of inflammatory signaling[J]. J Neuroinflammation, 2013, 10: 157. DOI: 10.1186/1742-2094-10-157.
- [5] Vecchione C, Frati A, Di Pardo A, et al. Tumor necrosis factor- α mediates hemolysis-induced vasoconstriction and the cerebral vasospasm evoked by subarachnoid hemorrhage[J]. Hypertension, 2009, 54(1): 150-156. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.128124.

- [6] Zheng VZ, Wong GKC. Neuroinflammation responses after subarachnoid hemorrhage: A review [J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 42: 7-11. DOI: 10.1016/j.jocn.2017.02.001.
- [7] Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 35-52. DOI: 10.1111/imr.12286.
- [8] Labzin LI, Heneka MT, Latz E. Innate Immunity and Neurodegeneration [J]. *Annu Rev Med*, 2018, 69: 437-449. DOI: 10.1146/annurev-med-050715-104343.
- [9] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241-247. DOI: 10.1038/ni.1703.
- [10] Wang Z, Wu L, You W, et al. Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway [J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(4): 399-408. DOI: 10.1111/jpi.12087.
- [11] Li J, Chen J, Mo H, et al. Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(4): 2668-2678. DOI: 10.1007/s12035-015-9318-8.
- [12] Feng L, Chen Y, Ding R, et al. P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and brain injury in a rat model of intracerebral hemorrhage: involvement of peroxynitrite [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 190. DOI: 10.1186/s12974-015-0409-2.
- [13] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6): 397-411. DOI: 10.1038/nri3452.
- [14] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 210-215. DOI: 10.1038/nri2725.
- [15] Dong Y, Fan C, Hu W, et al. Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling [J]. *J Pineal Res*, 2016, 60(3): 253-262. DOI: 10.1111/jpi.12300.
- [16] Jo EK, Kim JK, Shin DM, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2): 148-159. DOI: 10.1038/cmi.2015.95.
- [17] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136-140. DOI: 10.1038/ni.1831.
- [18] 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. DOI: 10.1038/ni.1631.
- [19] Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, et al. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Immunol*, 2011, 187(2): 613-617. DOI: 10.4049/jimmunol.1100613.
- [20] Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, et al. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation [J]. *Cell*, 2013, 153(2): 348-361. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.054.
- [21] Murakami T, Ockinger J, Yu J, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(28): 11282-11287. DOI: 10.1073/pnas.1117765109.
- [22] Zhang XS, Li W, Wu Q, et al. Resveratrol Attenuates Acute Inflammatory Injury in Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats via Inhibition of TLR4 Pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8).pii: E1331. DOI: 10.3390/ijms17081331.
- [23] Wu Q, Wang XL, Yu Q, et al. Inflammasome Proteins in Cerebrospinal Fluid of Patients with Subarachnoid Hemorrhage are Biomarkers of Early Brain Injury and Functional Outcome [J]. *World Neurosurg*, 2016, 94: 472-479. DOI: 10.1016/j.wneu.2016.07.039.
- [24] Yin D, Zhou S, Xu X, et al. Dexmedetomidine attenuated early brain injury in rats with subarachnoid haemorrhage by suppressing the inflammatory response: The TLR4/NF- κ B pathway and the NLRP3 inflammasome may be involved in the mechanism [J]. *Brain Res*, 2018, 1698: 1-10. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.05.040.
- [25] van Lieshout JH, Dibué-Adjei M, Cornelius JF, et al. An introduction to the pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosurg Rev*, 2018, 41(4): 917-930. DOI: 10.1007/s10143-017-0827-y.
- [26] Shao A, Wu H, Hong Y, et al. Hydrogen-Rich Saline Attenuated Subarachnoid Hemorrhage-Induced Early Brain Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Response: Possible Involvement of NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3462-3476. DOI: 10.1007/s12035-015-9242-y.
- [27] Cao S, Shrestha S, Li J, et al. Melatonin-mediated mitophagy protects against early brain injury after subarachnoid hemorrhage through inhibition of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2417. DOI: 10.1038/s41598-017-02679-z.
- [28] Chen S, Ma Q, Krafft PR, et al. P2X7R/cryopyrin inflammasome axis inhibition reduces neuroinflammation after SAH [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 58: 296-307. DOI: 10.1016/j.nbd.2013.06.011.
- [29] Li JR, Xu HZ, Nie S, et al. Fluoxetine-enhanced autophagy ameliorates early brain injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation following subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 186. DOI: 10.1186/s12974-017-0959-6.
- [30] Zhou K, Shi L, Wang Z, et al. RIP1-RIP3-DRP1 pathway regulates NLRP3 inflammasome activation following subarachnoid hemorrhage [J]. *Exp Neurol*, 2017, 295(14): 116-124. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.06.003.
- [31] Liu H, Zhao L, Yue L, et al. Pterostilbene Attenuates Early Brain Injury Following Subarachnoid Hemorrhage via Inhibition of the NLRP3 Inflammasome and Nox2-Related Oxidative Stress [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 5928-5940. DOI: 10.1007/s12035-016-0108-8.
- [32] Zhang X, Wu Q, Zhang Q, et al. Resveratrol Attenuates Early Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage via Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 611. DOI: 10.3389/fnins.2017.00611.

(收稿日期: 2019-01-25)

(本文编辑: 戚红丹)