

NLRP3 与急性痛风性关节炎相关作用研究进展

陈 昉, 童 娟, 姚 红

【关键词】 NLRP3; 急性痛风性关节炎; 抗炎免疫

【中图分类号】 R 589.7

【文献标识码】 A

doi:10.3969/j.issn.1009-2595.2014.12.044

痛风是一种单钠尿酸盐(monosodium urate, MSU)沉积所致的晶体相关性关节病,与嘌呤代谢紊乱及(或)尿酸排泄减少所致的高尿酸血症直接相关,属于代谢性风湿病范畴。主要表现为反复发作的急、慢性痛风性关节炎、痛风石、尿酸结石、尿酸性肾病等^[1]。急性痛风性关节炎是一种尿酸盐在关节及关节周围组织以结晶形式沉积引起的具有自限性和以剧烈疼痛为特点的急性无菌性炎症反应,是痛风最常见的首发症状。随着社会人群结构及饮食结构的变化,痛风的患病率呈逐年上升趋势。由于痛风性关节炎的反复发作特点,尤其是急性期所致的关节疼痛及关节破坏,不但给患者日常活动带来了障碍,并且需花费高昂的医疗费用。因此,通过各种途径减轻急性痛风患者的关节症状及防止关节破坏有重要意义。

1 炎性体

大分子炎性复合体—NLRPs(Nod-like receptor pyrin)是 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)家族中的亚家族,而 NLRs 是细胞内模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)的重要组成部分。PRRs 是一种种系编码的受体,固有免疫细胞募集 PRRs 识别微生物信号相关分子模式(microbial-associated molecular patterns, MAMPs)和内源性危险信号相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)^[3-4]。NLRP3 也称 NALP3,作为 NLRPs 家族中的典型代表,在骨髓源性的免疫细胞,特别是脾的树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞中大量表达。所有的 NLRs 共享 3 个同样的结构域:①位于 NLRPs 分子 C 端的富亮氨酸区域(leucine-rich repeat, LRR),是一个 20~29 个残基序列的区

域,可识别受体。②中央的核苷酸结合寡聚化区域,位于 NLRPs 分子的中央,对于 NLRPs 分子的寡聚化和活化非常重要,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 NLRPs 分子 N 端的一个热蛋白结构域(pyrin domain, PYD)^[5]。

1.1 NLRP3 炎性体激活的诱因

大量各种结构上无关的刺激均可激活 NLRP3,例如 DAMPs 及内源性相关分子,包括 MSU,淀粉样蛋白 β ,胆固醇结晶,胰岛淀粉样多肽和葡萄糖,脂肪酸,透明质酸和三磷酸腺苷等。除以上疾病外,暴露于环境污染物,如石棉和硅石及感染的各种病原体亦可激活 NLRP3,引起炎症级联放大效应。事实上,这么多不同的刺激触发 NLRP3 的活化和随后的炎症过程的形成,表明 NLRP3 是一种常见的许多不同细胞的触发器,导致过剩的促炎细胞因子产生的枢纽。

1.2 MSU 激活 NLRP3 炎性小体的机制

MSU 可能通过以下几种机制激活 NLRP3 炎性体:①巨噬细胞吞噬 MSU 后形成吞噬小体,MSU 的不溶性影响溶酶体膜的稳定性,溶酶体渗漏导致组织蛋白酶释放,如组织蛋白酶 B^[6],从而通过未知机制诱导激活 NLRP3^[7-9]。②MSU 刺激诱导细胞外三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)与 P2X7 受体(purinergic receptor p2x, ligand-gated ion channel, 7)结合^[10]导致快速 K⁺外流,从而促进募集和开放泛连接蛋白 1 孔,大分子,如微生物信号相关分子模式(microbial-associated molecular patterns, MAMPs)和损伤信号相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),即可通过泛连接蛋白 1 孔进入细胞质,从而吸引 NLRP3,阳离子失调也可能解释 NLRP3 的激活。③细胞吞噬 MSU 驱使还原型辅酶 II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)依赖的活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成,从而将硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting

【作者单位】 510120 广东广州,广州医科大学附属第一医院中医科(陈 昉、童 娟、姚 红)

【通讯作者】 陈 昉, E-mail: chenfang3332@hotmail.com

protein, TXNIP)由抗氧化蛋白硫氧还蛋白(TRX)上释放出来, TXNIP 结合 NLRP3 上的 LRR 域, 促进 NLRP3 相关抑制剂复合物(heat shock protein 90-suppressor of G2 allele of skp1HSP90-SGT1)的解离, 一系列的观测表明, 线粒体 ROS 的产生可能构成的统一的 NLRP3 激活机制, ROS 促进线粒体通透性转变, 进一步加强线粒体 ROS 的产生和促进 NLRP3 和 ASC 向线粒体集中^[11]。④当巨噬细胞无法完全吞噬 MSU 时形成细胞微管从而激活 NLRP3^[12]。⑤研究显示, 当 MSU 直接接触细胞膜导致细胞膜脂质重排而活化树突状细胞(Dendritic Cell, DC), 亦可介导炎症发生, NLRP3 也可能在其中起关键作用^[13]。当 NLRP3 识别的配体直接或间接地结合于 LRR 时, NLRP3 被活化而发生构象上的变化, 暴露出 NACHT 结构域, 通过 ATP 聚合形成高度有序的 NLRP3 蛋白寡聚体, 随后通过其效应结构域 PYD 募集 ASC(apoptosis associated speck-like CARD)和带有 CARD(Caspase activation recruitment domain)结构域的半胱天冬酶-1(Caspase-1), 形成复杂的复合物——NLRP3 炎性体(NLRP3 inflammasome)。ASC 作为细胞内的一种重要的连接蛋白, 能与炎症过程中的多种信号传导蛋白分子相互作用, 传递生化信号。ASC 的 CARD 与 Caspase-1 的 CARD 区相互作用, 活化的 Caspase-1 剪切白介素-1 β 前体(pro-IL-1 β)和白介素-18 前体(pro-IL-18), 使 IL-1 β 和 IL-18 成熟并释放。IL-1 β 和 IL-18 是固有监视和控制病原体入侵的关键因子, 释放至胞外的 IL-1 β 和 IL-18 通过核因子(nuclear factor, NF)- κ B 通路, 引起大量的促炎因子转录, 产生炎症级联放大效应。ASC 在 NF- κ B 信号通路具有双重调节特性^[14], ASC 与 NLRP3 结合能够导致 NF- κ B 的活化, 而仅 ASC 时, 通过抑制细胞内 I κ B 激酶(I- κ B Kinase, IKK)的磷酸化来抑制 NF- κ B 的活化。Caspase-1 也可以激活 NF- κ B, 并且 NF- κ B 的激活与 IL-1 β 的成熟同时发生^[15]。研究认为 NLRP3、ASC、pro-Caspase-1 组分单独存在时无致炎作用, 即只有 NLRP3 炎性复合体形成激活后才能发挥相关致炎作用^[5]。

1.3 NLRP3 在代谢性疾病中的作用

NLRP3 在无菌性炎症过程, 特别是一些代谢性疾病中的作用不断被发现^[16]。Lee 等^[17]研究发现, 2 型糖尿病患者外周血单核细胞中呈现出较高水平的 NLRP3、ASC、IL-1 β 、IL-18 mRNA 和蛋白表达, 其发生发展机制是通过促进线粒体 ROS 释放诱导 NLRP3 炎性体途径激活。Duewell 等^[18]研究结果表明, 在动

脉粥样硬化的发生发展过程中, 胆固醇结晶作为内源性危险信号, 其沉积在动脉或其他地方激活 NLRP3 炎性体是一个早期过程, 而不是一个后发炎症效应, 其激活与溶酶体膜破裂释放组织蛋白酶相关。Mulay 等^[19]研究表明, 肾内草酸钙沉积导致肾内炎症的机制需要通过 NLRP3/ASC/Caspase-1 诱导 DCs 中的 IL-1 β 成熟与释放, 而草酸钙晶体诱导 NLRP3 的活化依赖于细胞吞噬功能和钾离子外流, 其中所需 ATP 由草酸钙晶体诱导从死亡的细胞中释放。此外, 亦有研究证明补体途径与 NLRP3 炎性体相关。Laudis 等^[20]的研究提供了明确的证据表明, 补体聚集大量致死膜攻击复合物(membrane attack complexes, MAC), 其形成激活 NLRP3 炎性体, 促进 Caspase-1 的 IL-1 β 和 IL-18 的成熟过程。近年来, 大量研究证实 IL-1 拮抗剂可有效抑制不溶性晶体诱导的疾病^[21-22]。

2 NLRP3 在急性痛风性关节炎中的作用

Bakker 等^[23]发现, NLRP3 缺乏可防止高尿酸血症、微量白蛋白尿及在血浆中的钠和氯离子的下降等饮食导致的代谢失调, NLRP3 依赖的 IL-1 β 表达无上调, NLRP3 缺乏还可限制巨噬细胞在局部损伤部位大量聚集。Licandro 等^[24]提出, MSU 刺激通过氧化应激诱导的 DNA 损伤激活 NLRP3 炎性体, 而 NLRP3 炎性体可抑制 DNA 修复和增强先天细胞 p53 介导的细胞凋亡, 从而诱发炎性级联放大效应。McCall 等^[25-26]提出, NLRP3 促进成骨细胞吞噬尿酸盐结晶, 从而导致成骨细胞凋亡。Kolly 等^[27-28]研究发现, NLRP3 或 Caspase-1 缺陷的小鼠仍然易感关节炎, 而 ASC 缺陷小鼠可防止关节炎, ASC 作用于免疫介导的炎症, 但独立于与其相关的炎性伴侣蛋白, 如 NLRP3 和 Caspase-1, 由此可推测 ASC 是激活 NLRP3 炎性体途径炎症级联放大的关键位点。Hoffman^[29]等利用 NLRP3 炎性体 LRR 结构域缺失突变体小鼠研究证明了 LRR 结构域缺失可减少 MSU 结晶诱导的 Caspase-1 活化和 IL-1 β 释放, 指出 NLRP3 的 LRR 结构域具有潜在的直接或间接地识别结构无关的 PAMPs 或 DAMPs 从而激活炎性体诱发先天免疫炎症反应, 提出 LRR 结构域可能是 MSU 结晶引起的炎症反应中潜在的药物靶点。

3 NLRP3 相关途径治疗急性痛风性关节炎的研究进展

3.1 秋水仙素^[30]

秋水仙素是一种抗有丝分裂的生物碱, 通过结合到细胞骨架微管蛋白的特定位置从而破坏微管聚合。

细胞迁移障碍及细胞分裂障碍在一定范围内抑制了重要的细胞功能,从而减少趋化因子和细胞因子的分泌。体外研究表明,高浓度的秋水仙素通过阻断 MSU 刺激的单核细胞释放 IL-1 β 从而抑制炎症,但并不影响通过细胞外腺苷三磷酸激活的 IL-1 β ^[31],这表明,秋水仙碱在 NLRP3 炎性体激活 Caspase-1 的上游起作用。

3.2 IL-1 拮抗剂

生物制剂研究证实,IL-1 拮抗剂可有效抑制不溶性晶体诱导的疾病。IL-1 阻滞剂^[32-34]能完全中和人 IL-1 β 的人单克隆抗体活性的 IL-1R 辅助蛋白^[35],对急性痛风性关节炎具有一定疗效^[36]。研究还发现,IL-1 阻滞剂可能有效预防降尿酸过程中的痛风急性发作^[37-38]。IL-1 β 拮抗剂治疗痛风性关节炎的一般耐受性良好^[21,35,39]。有研究指出,罕见但严重的不良反应及免疫抑制导致感染风险的增加^[38,40]。故此类制剂目前仍未在临床运用于抗痛风的治疗。

3.3 Caspase-1 抑制剂

谷祖华等^[41]利用 Caspase-1 抑制剂干预急性痛风性关节炎大鼠模型发现,低剂量时无明显炎症抑制作用,而高剂量可不同程度抑制炎症发生。

4 NLRP3 潜在的双重性

Ramos 等^[42]发现,NLRP3 和 Caspase-1 缺陷的动物比 IL-1R 基因缺陷动物更容易受到病毒毒素影响,由此推测 NLRP3 炎性体在病毒入侵初期的表现增加属于一种免疫保护反应。另一方面,炎性体可感知外界的刺激(如病毒和细菌),然后诱发炎症反应,使感染加重^[43]。有文献提出了 NLRP3 炎性体的这种双重性,在肺部感染急性期,NLRP3 的活化对病毒和细菌的清除是非常重要的,然而吸入刺激物后 NLRP3 的持续激活可导致肺部有害的慢性炎症^[44]。虽然 NLRP3 炎性体在痛风相关疾病的双重性缺乏充分的研究支持,但不排除 NLRP3 对 MSU 相关疾病存在免疫保护的可能。

5 结论与展望

NLRP3 炎性体不仅在急性痛风性关节炎,而且在各类感染、损伤性疾病及代谢性疾病等中均发挥重要作用,NLRP3 炎性体途径的阻滞可能成为各种慢性炎症及代谢性疾病防治的重要策略之一。大量研究均提示了 NLRP3、ASC、Caspase-1 是炎性体激活的关键转接点,IL-1、IL-18 等炎性因子是炎性体激活后致炎的终产物,为目前防治急性痛风性关节炎等代谢性疾病的研究要点。目前研究成果为我们指出了几个探讨的

方向:①直接对诱发炎症的 Caspase-1、IL-1、IL-18 等炎症因子作干预;②通过抑制炎性体的激活从而阻断致炎终产物的激活释放;③改变基因组学从而改变 NLRP3 炎性体的功能。进一步深入研究以阐明其在急性慢性代谢性炎症疾病的调控机制,有利于提供新的诊疗思路与手段,有利于确立药物靶点从而开发针对特异性治疗的药物。需要强调的是,根据 NLRP3 炎性体的免疫保护及致炎双重性,在对其做出干预的同时需要考虑其对机体的整体影响。从祖国医学的整体观念出发,寻找一个能加强其免疫保护作用的同时减轻其炎性级联反应的治疗方法,对痛风及 NLRP3 相关疾病的预防和治疗都具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会风湿病学分会. 原发性痛风诊断和治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志,2011,15(6):410-413
- [2] 张玉梅,王 荟. 痛风发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2012,(15):2441-2444
- [3] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell,2010,140(6):805-820
- [4] Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors[J]. Yonsei Med J,2011,52(3):379-392
- [5] Zambetti LP, Laudisi F, Licandro G, et al. The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation... and a lot more[J]. Immunol Res,2012,53(1-3):78-90
- [6] Chu SC, Yang SF, Tzang BS, et al. Cathepsin B and cystatin C play an inflammatory role in gouty arthritis of the knee[J]. Clin Chim Acta,2010,411(21-22):1788-1792
- [7] 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
- [8] Migita K, Koga T, Satomura K, et al. Serum amyloid A triggers the monosodium urate-mediated mature interleukin-1beta production from human synovial fibroblasts[J]. Arthritis Res Ther,2012,14(3):R119
- [9] Valimaki E, Miettinen JJ, Lietzen N, et al. Monosodium urate activates Src/Pyk2/PI3 kinase and cathepsin dependent unconventional protein secretion from human primary macrophages[J]. Mol Cell Proteomics,2013,12(3):749-763
- [10] Tao J H, Zhang Y, Li X P. P2X7R: a potential key regulator of acute gouty arthritis[J]. Semin Arthritis Rheum, 2013, 43(3): 376-380
- [11] Heid ME, Keyel PA, Kamga C, et al. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation[J]. J Immunol,2013,191(10):5230-5238
- [12] Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica [J]. Science,2008,320(5876):674-677
- [13] Ng G, Sharma K, Ward SM, et al. Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells[J]. Immunity,2008,29(5):807-818
- [14] Stehlik C, Fiorentino L, Dorfleutner A, et al. The PAAD/

- PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor kappaB activation pathways[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(12): 1605-1615
- [15] Zambetti LP, Laudisi F, Licandro G, *et al.* The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation... and a lot more[J]. *Immunol Res*, 2012, 53(1-3): 78-90
- [16] De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease[J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(8): 373-379
- [17] Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, *et al.* Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2013, 62(1): 194-204
- [18] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361
- [19] Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, *et al.* Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 236-246
- [20] Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, *et al.* Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1beta release[J]. *J Immunol*, 2013, 191(3): 1006-1010
- [21] So A, De Smedt T, Revaz S, *et al.* A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(2): R28
- [22] Torres R, Macdonald L, Croll SD, *et al.* Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(10): 1602-1608
- [23] Bakker PJ, Butter LM, Kors L, *et al.* Nlrp3 is a key modulator of diet-induced nephropathy and renal cholesterol accumulation[J]. *Kidney Int*, 2013, 85(5): 1112-1122
- [24] Licandro G, Ling KH, Beretta O, *et al.* The NLRP3 inflammasome affects DNA damage responses after oxidative and genotoxic stress in dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(8): 2126-2137
- [25] Mccall SH, Sahraei M, Young AB, *et al.* Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death[J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(1): 30-40
- [26] Allaey I, Marceau F, Poubelle PE. NLRP3 promotes autophagy of urate crystals phagocytized by human osteoblasts[J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(6): R176
- [27] Kolly L, Karababa M, Joosten LA, *et al.* Inflammatory role of ASC in antigen-induced arthritis is independent of caspase-1, NALP-3, and IPAF[J]. *J Immunol*, 2009, 183(6): 4003-4012
- [28] Ippagunta SK, Brand DD, Luo J, *et al.* Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12454-12462
- [29] Hoffman HM, Scott P, Mueller JL, *et al.* Role of the leucine-rich repeat domain of cryopyrin/NALP3 in monosodium urate crystal-induced inflammation in mice[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(7): 2170-2179
- [30] Scarpignato C, Hunt RH. Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: clinical picture, pathogenesis, and prevention[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2010, 39(3): 433-464
- [31] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, *et al.* Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 237-241
- [32] So A, De Smedt T, Revaz S, *et al.* A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(2): R28
- [33] So A, De Meulemeester M, Pikhak A, *et al.* Canakinumab for the treatment of acute flares in difficult-to-treat gouty arthritis: Results of a multicenter, phase II, dose-ranging study[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 3064-3076
- [34] Neogi T. Interleukin-1 antagonism in acute gout: is targeting a single cytokine the answer[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(10): 2845-2849
- [35] Chen CJ, Shi Y, Hearn A, *et al.* MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2262-2271
- [36] Yagnik DR, Evans BJ, Florey O, *et al.* Macrophage release of transforming growth factor beta1 during resolution of monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(7): 2273-2280
- [37] 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[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(7): 1264-1271
- [38] Schumacher HJ, Evans RR, Saag KG, *et al.* Riloncept (interleukin-1 trap) for prevention of gout flares during initiation of uric acid-lowering therapy: results from a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled, confirmatory efficacy study[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(10): 1462-1470
- [39] Furst DE. The risk of infections with biologic therapies for rheumatoid arthritis[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2010, 39(5): 327-346
- [40] Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(8): 633-652
- [41] 谷祖华, 苗志敏, 李长贵. Caspase-1 抑制剂对大鼠急性痛风性关节炎的作用[J]. *青岛大学医学院学报*, 2009, 45(5): 437-440
- [42] Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G, *et al.* IL-1beta signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11): e1003039
- [43] Im H, Ammit AJ. The NLRP3 inflammasome: role in airway inflammation[J]. *Clin Exp Allergy*, 2014, 44(2): 160-172
- [44] De Nardo D, De Nardo CM, Latz E. New insights into mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome and its role in lung disease[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(1): 42-54