

## 焦亡在脓毒症中的研究进展

沈灵芝<sup>1,2</sup> 李莉<sup>1</sup> 严静<sup>1</sup>

<sup>1</sup>浙江医院重症医学科,浙江杭州 310013; <sup>2</sup>温州医科大学,浙江温州 325000

通信作者:严静, Email: yanjing2013@163.com

**【摘要】** 脓毒症是由感染引起的宿主免疫反应异常而导致的威胁生命的器官功能障碍综合征。细胞焦亡是新近发现的一种依赖天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase-1、caspase-11、caspase-4、caspase-5),以释放炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和IL-18为特征的程序性细胞死亡方式。本文通过综述细胞焦亡的分子机制以及焦亡与脓毒症的相关研究,为脓毒症治疗提供新思路与新靶点。

**【关键词】** 脓毒症; 焦亡; 炎症

**基金项目:** 国家自然科学基金(81772051); 浙江省中医药科技项目(2019ZB004)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.026

### Research progress of pyroptosis in sepsis

Shen Lingzhi<sup>1,2</sup>, Li Li<sup>1</sup>, Yan Jing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, Zhejiang, China; <sup>2</sup>Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Yan Jing, Email: yanjing2013@163.com

**【Abstract】** Sepsis is an organ dysfunction syndrome caused by an abnormal host immune response because of infection. Pyroptosis is a newly discovered programmed cell death relies on caspase-1, caspase-11, caspase-4, caspase-5 and is characterized by the release of inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-18. The exploration of the molecular mechanisms of pyroptosis and the correlation between pyroptosis and sepsis can provide new ideas and new targets for the treatment of sepsis.

**【Key words】** Sepsis; Pyroptosis; Inflammation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81772051); Chinese Traditional Medicine Science and Technology Project of Zhejiang Province (2019ZB004)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.026

脓毒症是由宿主对感染反应失调引起的威胁生命的器官功能障碍。到目前为止,脓毒症仍然是重症加强治疗病房(ICU)患者死亡的主要原因之一。焦亡是一种特殊的程序性细胞死亡,其特征在于释放炎症因子。在脓毒症期间,适度的焦亡可以防御细菌感染从而使组织损伤最小化,但是过度活化的焦亡可导致脓毒性休克、多器官功能障碍或增加继发感染的风险<sup>[1]</sup>。越来越多的证据表明焦亡参与了脓毒症的发病机制,抑制细胞过度焦亡可能成为脓毒症治疗的新思路。现通过综述焦亡的分子机制以及焦亡与脓毒症的相关研究,以期脓毒症治疗提供新靶点。

### 1 焦亡

**1.1 焦亡的概念:** 焦亡是炎症性程序性细胞死亡<sup>[2]</sup>,其由微生物感染和内源性损伤相关信号诱导,依赖于天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase-1、caspase-4、caspase-5、caspase-11),以切割 Gasdermin D (GSDMD,一类保守蛋白家族成员)使其活性 N-末端片段(GSDMD-NT)在质膜中低聚形成膜孔<sup>[3]</sup>、释放促炎因子[白细胞介素(IL-1 $\beta$ 、IL-18)]为主要特征,是宿主抵抗病原体感染的天然免疫防御机制之一<sup>[4]</sup>。

**1.2 炎症小体组成:** 炎症小体的形成是对侵入微生物病原体或细胞内危险信号的响应,在焦亡机制中具有关键作用。

炎症小体是由炎症小体传感器分子、衔接蛋白 ASC(包含 CARD 的凋亡相关斑点样蛋白)和 caspase 组成的一组多聚体蛋白质复合物<sup>[5-8]</sup>。

常见的炎症小体传感器分子有: NOD 样受体(NLR)传感器分子(即 NLRP1、NLRP3、NLRP6、NLRP7、NLRC4)及含有 PYHIN(含 pyrin 和 HIN 结构域)家族成员的缺失黑素瘤 2(AIM2)和  $\gamma$ -干扰素诱导蛋白 16(IFI16)。炎症小体传感器分子通过 ASC 连接至 caspase。ASC 由 2 个死亡区域构成,即 pyrin 结构域以及 caspase 激活和募集结构域(CARD)。ASC 通过 pyrin 结构域与上游炎症小体传感器分子相互作用,这种相互作用触发 ASC 装配成大量蛋白质斑点,主要由 ASC 二聚体寡聚化而成。ASC 通过 CARD,使 caspase-1 前体(pro-caspase-1)的单体靠近,从而启动 caspase-1 的自我切割和活化,使其成为非共价连接的 p10 和 p20 亚基的活性酶,水解并活化促炎因子(如 IL-1 $\beta$ 、IL-18)和 GSDMD,从而导致焦亡。

**1.3 焦亡发生的途径:** 焦亡发生有依赖 caspase-1 的经典细胞焦亡途径和非 caspase-1 依赖的细胞焦亡途径两种。

**1.3.1 依赖 caspase-1 的经典细胞焦亡途径:** 经典途径的激活通常需要 2 个信号。第一个信号为上调焦亡相关蛋白的表达。该过程需要 Toll 样受体(TLRs)参与,从而激活核转

录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)等通路介导的促炎因子如 IL-1 $\beta$ 、IL-18 及其他焦亡相关蛋白的转录和表达。第二个信号包括由三磷酸腺苷(ATP)结合 P2X 嘌呤受体 7(P2X7R)引起的 K<sup>+</sup>外流,由尿酸盐晶体引起的溶酶体去稳定化,以及线粒体中 DNA 和活性氧(ROS)的产生,从而导致炎症小体复合物组装与激活,进而激活 caspase-1,活化的 caspase-1 促进 IL-1 $\beta$  前体(pro-IL-1 $\beta$ ), pro-IL-18 成熟并裂解 GSDMD 使其释放 GSDMD-NT,在细胞的质膜中形成孔,导致 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 GSDMD-NT 释放,促使细胞焦亡<sup>[6]</sup>。

**1.3.2 非 caspase-1 依赖的细胞焦亡途径:**小鼠 caspase-11 及人类 caspase-4、caspase-5 通过非 caspase-1 依赖的途径诱导细胞焦亡<sup>[9]</sup>。有研究表明,细胞内脂多糖(LPS)作为非经典通路的触发因子<sup>[10-11]</sup>,以高亲和力直接与 caspase-4、caspase-5、caspase-11 结合,导致 caspase-4、caspase-5 和 caspase-11 的自组装、激活并通过切割 GSDMD 引发细胞焦亡。活化的 caspase-4、caspase-5、caspase-11 不直接切割促炎因子前体(pro-IL-1 $\beta$ 、pro-IL-18),而是通过激活 NLRP3 炎症小体和 caspase-1 间接加工它们<sup>[5,12]</sup>。

**1.4 焦亡途径的内源性负性调节:**机体为了平衡焦亡途径的过度激活,存在负反馈调节通路,但是负反馈调节通路目前还不是很清楚。有研究表明,NLRP3 炎症小体的去泛素化是其组装和激活所必需的<sup>[13-14]</sup>,通过抑制 NLRP3 去泛素化可有效抑制 NLRP3 炎症小体的激活,其中环磷酸腺苷-蛋白激酶 A(cAMP-PKA)信号通路扮演着重要角色。胆汁酸通过跨膜蛋白耦联受体 5(TGR5)-cAMP-PKA 轴诱导 NLRP3 泛素化从而抑制其激活;此外,NLRP3 的泛素化可能与 PKA 对鼠 NLRP3 的 Ser 291 磷酸化有关,磷酸化缺陷型 NLRP3 S291A 则损害 PKA 驱动的 NLRP3 磷酸化和泛素化<sup>[15]</sup>。神经递质多巴胺(DA)通过多巴胺 D1 受体(DRD1)抑制 NLRP3 炎症小体的激活。DRD1 信号通过第二信使 cAMP 负性调节 NLRP3 炎症小体,cAMP 与 NLRP3 结合并通过 E3 泛素连接酶 MARCH7 促进其泛素化和降解<sup>[16]</sup>。前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)通过 PGE<sub>2</sub> 受体 E-前列腺素 4(EP4)信号诱导 cAMP-PKA,PKA 直接磷酸化人的 NLRP3 Ser 295 并减弱其 ATP 酶功能,从而抑制 NLRP3 的激活<sup>[17]</sup>。

## 2 焦亡与脓毒症的关系

越来越多的研究表明,焦亡与脓毒症息息相关。一项前瞻性研究纳入了 60 例创伤患者和 10 例健康对照者,通过检测伤后 24 h 内外周血单个核细胞(PBMC)焦亡百分比和炎症因子水平显示,入院时脓毒症患者( $n=33$ )PBMC 焦亡百分比及 IL-6、IL-18、趋化蛋白-1(MCP-1)水平高于非脓毒症患者( $n=27$ ),并且 PBMC 焦亡百分比与创伤患者的严重程度和炎症状态显著相关,表明 PBMC 焦亡是预测创伤后脓毒症发展较好的生物标志物<sup>[18]</sup>。另一项纳入 27 例继发于社区获得性肺炎的脓毒症患者的研究中,获取了入院时和随访 7 d 后的 PBMC,通过聚合酶链反应(PCR)阵列测试与核苷酸结合寡聚化结构域和富含亮氨酸重复序列(NLR)炎症小体相关的 35 个基因,评估脓毒症患者炎症小体信号通路

中涉及的基因表达、其相互作用网络以及在幸存者与非幸存者中的预测功能。结果显示,与健康者相比,脓毒症患者 NLRP3、IL-1 $\beta$  和 IL-18 的表达水平明显升高;这种变化在幸存者与非幸存者中也有相似的表现,表明脓毒症患者 NLR 炎症小体级联激活的基因发生了显著改变,脓毒症死亡患者这些基因表达更明显<sup>[19]</sup>。上述研究表明,炎症小体激活引发的焦亡是脓毒症的关键致病介质,因此,抑制焦亡可能为脓毒症治疗提供新思路。

抑制 caspase-1 经典焦亡通路治疗脓毒症已在一些研究中得到证实。野黄芩苷是从灯盏花中纯化来的黄酮类化合物,具有抗炎活性。Liu 等<sup>[20]</sup>用 LPS 联合 ATP 或尼日利亚菌素刺激巨噬细胞诱导焦亡模型。结果显示:野黄芩苷预处理可抑制巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的激活,阻止 ASC 斑点形成及其寡聚化,减少 caspase-1 激活和成熟 IL-1 $\beta$  释放,从而抑制细胞焦亡;此外,PKA 信号通路在野黄芩苷抑制 NLRP3 炎症小体激活中起作用,野黄芩苷对 NLRP3 炎症小体的抑制作用可完全被 PKA 抑制剂 H89 抵消。在动物水平,通过腹腔注射致死剂量大肠杆菌制备小鼠脓毒症模型,口服野黄芩苷可明显降低血清 IL-1 $\beta$  水平,减少肝脏炎症细胞浸润,并提高小鼠存活率。Kim 等<sup>[21]</sup>研究发现,SESN2(一种应激诱导的蛋白)在脓毒症小鼠和患者的单核/巨噬细胞中表达显著升高,它通过抑制单核/巨噬细胞 NLRP3 炎症小体依赖的 caspase-1 激活,减少炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平,从而减轻器官损伤,提高脓毒症存活率。Pfalzgraff 等<sup>[22]</sup>研究发现,Pep19-2.5(一种合成的抗内毒素肽)能有效中和革兰阴性菌及革兰阳性菌的致病因子,从而对脓毒症起保护作用。进一步研究显示,LPS 转染人急性单核细胞白血病细胞株(THP-1)单核细胞和巨噬细胞后,能够显著减少 IL-1 $\beta$  和乳酸脱氢酶(LDH)的分泌,降低高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的产生和 caspase-1 的活化。Pu 等<sup>[23]</sup>研究发现,自噬相关蛋白 7(Atg7)参与了脓毒症中炎症小体的激活和细胞焦亡。与野生型小鼠相比,Atg7 敲除小鼠病原体清除受损,细菌广泛传播到血液和器官(如肺),导致动物存活率降低。Atg7 缺失的巨噬细胞中 caspase-1 明显激活,IL-1 $\beta$  释放增多,这些结果为脓毒症期间 Atg7 在宿主防御中的功能提供了新的见解。

最近有研究证实,抑制 caspase-11 等非经典焦亡通路对脓毒症同样具有保护作用。氧化磷脂 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(oxPAPC)具有抗炎作用,Chu 等<sup>[24]</sup>研究发现,oxPAPC 除具有拮抗 TLR4 作用外,还与 LPS 竞争性结合 caspase-4 和 caspase-11,从而抑制 LPS 诱导的细胞焦亡,减少 IL-1 $\beta$  释放,提高脓毒症小鼠的存活率。Song 等<sup>[25]</sup>研究发现,与野生型小鼠相比,S1PR2 缺陷小鼠能减少腹腔来源巨噬细胞焦亡,提高脓毒症存活率。这些有益的作用归因于 S1PR2 缺乏从而抑制了巨噬细胞 caspase-11 的激活。Napier 等<sup>[26]</sup>研究发现,羧肽酶 B1(Cpb1,一种补体相关蛋白)可作为巨噬细胞中 caspase-11 基因表达和随后 caspase-11 依赖性细胞死亡的新型媒介。Cpb1 修饰补体 C3

的切割产物 C3a,使其结合并激活 C3aR,通过 Cpb1-C3-C3aR 通路增加 caspase-11 的表达,从而影响炎症因子水平、脓毒症小鼠严重程度及存活率;然而使用 C3aR 抑制剂可抵消上述作用。提示 C3aR 可能成为脓毒症早期靶向治疗的选择之一。另外研究还显示,与健康对照者相比,脓毒症患者 PBMC 中 C3aR 和 caspase-5 显著上调,表明 C3aR 和 caspase-5 转录物可能作为诊断人类脓毒症的生物标志物。

不仅免疫细胞焦亡参与了脓毒症的发生发展,器官微血管内皮细胞焦亡同样也参与了脓毒症的病理生理。急性肺损伤(ALI)是由肺内皮屏障严重破坏导致的肺水肿、促炎性细胞浸润和难治性低氧血症,它是脓毒症死亡的主要原因。Cheng 等<sup>[27]</sup>研究发现,转染 LPS 至胞内可引起 caspase-11 介导的肺脏微血管内皮细胞焦亡,而缺失 caspase-11 的肺脏微血管内皮细胞能减少胞内 LPS 引起的肺水肿以及中性粒细胞积聚和焦亡。先天淋巴细胞 2 组(ILC2)是先天淋巴细胞(ILC1、ILC2 和 ILC3)的 3 个亚组之一,Lai 等<sup>[28]</sup>通过盲肠结扎穿孔术(CLP)致小鼠脓毒症模型研究发现,脓毒症后释放的 IL-33 通过其受体 ST2 介导肺中的 ILC2 增加;进一步研究显示,肺中 ILC2 分泌 IL-9,其反过来通过减弱 caspase-1 激活来防止肺内皮细胞焦亡。

### 3 小结

现有的证据表明,焦亡可以保护宿主免受入侵病原菌和微生物感染,然而焦亡过度活化也会引起脓毒性休克、多器官功能障碍,所以,适当控制焦亡的程度,通过靶向干预焦亡通路上的关键点,如炎症小体的组装、激活和激活后的修饰,可能为脓毒症治疗带来新的方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Gao YL, Zhai JH, Chai YF. Recent advances in the molecular mechanisms underlying pyroptosis in sepsis [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 5823823. DOI: 10.1155/2018/5823823.
- [2] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277 (1): 61-75. DOI: 10.1111/immr.12534.
- [3] Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: effectors of pyroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27 (9): 673-684. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.05.005.
- [4] Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265 (1): 130-142. DOI: 10.1111/immr.12287.
- [5] Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 1 (7): 677-687. DOI: 10.1038/nm.3893.
- [6] Mathur A, Hayward JA, Man SM. Molecular mechanisms of inflammasome signaling [J]. *J Leukoc Biol*, 2018, 103 (2): 233-257. DOI: 10.1189/jlb.3MR0617-250R.
- [7] 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.
- [8] von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, et al. Recognition of bacteria by inflammasomes [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 73-106. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095944.
- [9] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11 [J]. *Nature*, 2011, 479 (7371): 117-121. DOI: 10.1038/nature10558.
- [10] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4 [J]. *Science*, 2013, 341 (6151): 1246-1249. DOI: 10.1126/science.1240248.
- [11] Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. *Nature*, 2014, 514 (7521): 187-192. DOI: 10.1038/nature13683.
- [12] Yang J, Zhao Y, Shao F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 32: 78-83. DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.007.
- [13] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (43): 36617-36622. DOI: 10.1074/jbc.M112.407130.
- [14] Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity [J]. *Mol Cell*, 2013, 49 (2): 331-338. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.11.009.
- [15] Guo C, Xie S, Chi Z, et al. Bile acids control inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. *Immunity*, 2016, 45 (4): 944. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.10.009.
- [16] Yan Y, Jiang W, Liu L, et al. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. *Cell*, 2015, 160 (1-2): 62-73. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.047.
- [17] Mortimer L, Moreau F, MacDonald JA, et al. NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17 (10): 1176-1186. DOI: 10.1038/ni.3538.
- [18] Wang YC, Liu QX, Liu T, et al. Caspase-1-dependent pyroptosis of peripheral blood mononuclear cells predicts the development of sepsis in severe trauma patients: a prospective observational study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97 (8): e9859. DOI: 10.1097/MD.0000000000009859.
- [19] Esquerdo KF, Sharma NK, Brunialti MKC, et al. Inflammasome gene profile is modulated in septic patients, with a greater magnitude in non-survivors [J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 189 (2): 232-240. DOI: 10.1111/cei.12971.
- [20] Liu Y, Jing YY, Zeng CY, et al. Scutellarin suppresses NLRP3 inflammasome activation in macrophages and protects mice against bacterial sepsis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 8: 975. DOI: 10.3389/fphar.2017.00975.
- [21] Kim MJ, Bae SH, Ryu JC, et al. SESN2/sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages [J]. *Autophagy*, 2016, 12 (8): 1272-1291. DOI: 10.1080/15548627.2016.1183081.
- [22] Pflanzgraff A, Heinbockel L, Su Q, et al. Synthetic anti-endotoxin peptides inhibit cytoplasmic LPS-mediated responses [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 140: 64-72. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.05.015.
- [23] Pu Q, Gan C, Li R, et al. Atg7 deficiency intensifies inflammasome activation and pyroptosis in *Pseudomonas* sepsis [J]. *J Immunol*, 2017, 198 (8): 3205-3213. DOI: 10.4049/jimmunol.1601196.
- [24] Chu LH, Indramohan M, Ratsimandresy RA, et al. The oxidized phospholipid oxPAPC protects from septic shock by targeting the non-canonical inflammasome in macrophages [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 996. DOI: 10.1038/s41467-018-03409-3.
- [25] Song F, Hou J, Chen Z, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 signaling promotes caspase-11-dependent macrophage pyroptosis and worsens *Escherichia coli* sepsis outcome [J]. *Anesthesiology*, 2018, 129 (2): 311-320. DOI: 10.1097/ALN.0000000000002196.
- [26] Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, et al. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity [J]. *J Exp Med*, 2016, 213 (11): 2365-2382. DOI: 10.1084/jem.20160027.
- [27] Cheng KT, Xiong S, Ye Z, et al. Caspase-11-mediated endothelial pyroptosis underlies endotoxemia-induced lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127 (11): 4124-4135. DOI: 10.1172/JCI94495.
- [28] Lai D, Tang J, Chen L, et al. Group 2 innate lymphoid cells protect lung endothelial cells from pyroptosis in sepsis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (3): 369. DOI: 10.1038/s41419-018-0412-5.