

· 综述 ·

NLRP3 炎性小体与糖尿病肾病

杨可来尔 匡洪宇

【摘要】 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体是由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和 caspase-1 组成的蛋白复合体, 通过识别病原微生物等危险信号, 促进白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 的分泌和释放, 进而引起炎症反应。糖尿病肾病作为一种炎性相关疾病, 可被多种炎性介质介导, 而 NLRP3 炎性小体与糖尿病肾病的发生关系密切, 并受多种信号通路的调节, 其中丝裂原活化蛋白激酶信号通路是重要的关键环节。此外, 活性氧簇也参与了 NLRP3 炎性小体介导的糖尿病肾病的发展。

【关键词】 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体; 糖尿病肾病; 炎症

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (D201253)

NLRP3 inflammasome and diabetic nephropathy Yang Kelai'er, Kuang Hongyu. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China

Corresponding author: Kuang Hongyu, Email: ydykuanghongyu@126.com

【Abstract】 NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome is a kind of protein complex that composes of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and caspase-1, which causes inflammatory reaction through the identification of danger signals such as pathogenic microorganisms, and then promotes the secretion and release of interleukin (IL)-1 β and IL-18. Diabetic nephropathy is regarded as an inflammation-related disease which can be mediated by a variety of inflammatory mediators, while NLRP3 inflammasome is closely associated with diabetic nephropathy and regulated by multiple signaling pathways. Among them, mitogen-activated protein kinase pathway plays an important role. In addition, reactive oxygen species are also involved in the development of diabetic nephropathy mediated by NLRP3 inflammasome.

【Key words】 NOD-like receptor protein 3 inflammasome; Diabetic nephropathy; Inflammation

Fund program: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China (D201253)

糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病患者常见的微血管并发症, 在我国的发病率持续上升, 目前已成为导致慢性肾脏疾病终末期的第二大原因, 其发病机制复杂。众多研究发现, 炎症反应、多元醇代谢通路激活、蛋白激酶 C (PKC) 激活、晚期糖基化终末产物 (AGE) 生成、氧化应激、肾素-血管紧张素 II-醛固酮系统激活等机制均参与其中。有研究认为, 糖尿病肾病的炎症反应可能是众多机制中关键的下游环节, 持续的血液循环障碍和高血糖状态促进炎症因子释放和肾小球硬化, 硬化的肾小球促进多种炎症因子的滤过, 使肾小管上皮细胞释放更多的炎症细胞因子, 如白细胞介素 (IL)-1、肿瘤坏死因子

(TNF)- α 、IL-6 等, 多种炎症反应通路被激活, 异常的细胞内信号引发一系列代谢紊乱, 最终导致肾小球高滤过及肾间质纤维化^[1-2]。炎性小体是一类通过激活 caspase-1 并促进炎症细胞因子成熟, 在炎症反应中识别危险信号并产生效应的蛋白复合体, 常见的识别分子有 NOD 样家族 (NLR) 及 AIM2 样受体家族 (ALR) 等。近年研究发现, NOD 样家族中的 NOD 样蛋白 (NLRP3) 炎性小体在调控 DN 中起重要作用。本文主要就 NLRP3 炎性小体及其在 DN 中的作用及机制进行概述。

1 NLRP3 炎性小体概述

固有免疫作为机体抵抗病原体的第一道防线, 通过模式识别受体 (PRR) 识别入侵的病原微生物及内源性危险信号, PRR 主要分为两类, 其中研究较多的是位于细胞膜上的 Toll 样受体 (TLR), 它可识别外来入侵的病原体并激活胞内级联反应, 同时募

集免疫细胞进而调控适应性免疫应答。另一种是位于细胞质内的 NLR, NLRP3 作为 NLR 的成员之一, 可识别病原微生物后组装成 NLRP3 炎性小体, 进而促进 IL-1 β 和 IL-18 的分泌和释放, 引起炎症反应^[3]。

2 NLRP3 炎性小体的结构

NLRP3 炎性小体是相对分子质量约为 700 000 的蛋白复合物。其组成包括 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和 caspase-1。其中 NLRP3 是复合物中的核心蛋白, 包含 3 个不同的结构域: 位于 N-末端的 PYRIN 域 (PYD), 介导信号转导过程中的蛋白质-蛋白质相互作用; 位于中心的 NACHT 结构域, 对 NLRP3 的活化起至关重要的作用; 位于 C-末端的一个富含亮氨酸重复域 (LRR), 负责识别病原微生物。ASC 作为 NLRP3 炎性小体中重要的接头蛋白, 能连接上游的 NLRP3 并招募下游的 caspase-1 前体^[4]。Caspase-1 又称为 IL-1 β 裂解酶, 是 NLRP3 炎性小体的效应蛋白, 通过自身催化作用水解成有活性的 P10 和 P20 亚基, P20 亚基诱导 IL-1 β 前体成熟和分泌 IL-1 β 。IL-1 β 和 IL-18 通过调节 T 细胞亚群影响适应性免疫, 参与炎症反应并调节免疫应答^[5]。

3 NLRP3 炎性小体的激活

多种内源性 & 外源性的刺激信号能激活 NLRP3 炎性小体并促进其组装、活化, 内源性信号主要有活性氧簇、ATP、尿酸盐结晶、胆固醇结晶、 β 淀粉样蛋白以及细胞坏死产物等, 外源性信号包括病毒、细菌和真菌等^[6]。目前尚未明确其激活机制, 研究认为主要有以下几种炎性小体的激活模式假说。

3.1 钾离子外流 代谢产生并释放到胞外的 ATP 与细胞膜上的钾离子通道相互作用, 促进胞内钾离子迅速外流, 同时激活嘌呤能离子通道型受体 7 (P2X7R) 并促进通道蛋白 pannexin-1 的募集, 使其在细胞膜上的孔道开放, 存在于胞外的可激活 NLRP3 炎性小体的物质由此进入细胞内并促进 NLRP3 炎性小体的活化^[3]。

3.2 溶酶体损伤 某些结晶物质如明矾、 β 淀粉样蛋白、二氧化硅等可激活 NLRP3 炎性小体的物质被细胞内吞后导致溶酶体损伤, 其中的组织蛋白酶 B 释放到胞质中并促进 NLRP3 炎性小体的激活。也有研究表明, 单纯溶酶体膜的损伤也可激活 NLRP3 炎性小体^[7]。

3.3 活性氧簇激活 多种内源性 & 外源性可激活 NLRP3 炎性小体的物质都可引起大量活性氧簇产

生, 而活性氧簇亦可激活 NLRP3 炎性小体的组装及活化, 尤其在线粒体代谢紊乱时, 活性氧簇在激活 NLRP3 炎性小体中起关键作用^[7]。

最近研究发现, 在高糖刺激下活性氧簇可激活 NLRP3 炎性小体, 活化磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 进而促进 caspase-1 激活, 并分泌 IL-1 β 等炎症因子, 多种炎症细胞及炎症介质在细胞外基质中过度积累而损伤肾小管上皮细胞并加速肾小球硬化的过程^[8]。同时, Feng 等^[9] 发现, 高糖状态使体内的硫氧还原蛋白的内源性抑制因子硫氧还原蛋白相互作用蛋白 (TXNIP) 表达上调, TXNIP 增多后与硫氧还原蛋白的结合力减弱, 细胞的抗氧化还原作用下降, 使细胞处于易受损的状态。当活性氧簇与硫氧还原蛋白结合, TXNIP 与蛋白解离, 同时活性氧簇与 NLRP3 炎性小体特异性结合并活化下游的 caspase-1, 促进 IL-1 β 和 IL-18 的释放。

4 NLRP3 炎性小体在 DN 发展中的作用

4.1 NLRP3 炎性小体对肾小球的影响 当机体处于高血糖、高血脂等代谢紊乱的状态时, 肾小球系膜细胞和足细胞 IL-1 β 、IL-18、ASC 和 NLRP3 水平升高, 提示肾小球系膜细胞和足细胞可以形成炎性小体并触发炎症反应的级联反应^[10]。Abais 等^[11] 在 DN 小鼠模型中发现, 抑制足细胞 ACS 的表达可减轻其炎症反应并使肾小球硬化减弱, 同时降低尿白蛋白排泄量。近期研究也证实, NLRP3 炎性小体在 DN 小鼠的肾小球中大量表达, 抑制 NLRP3 炎性小体中的 NLRP3、ASC、caspase-1 或抑制 IL-1 受体的表达, 小鼠的尿白蛋白/肌酐比值下降, 镜下观察到足细胞和肾小球系膜细胞在形态上更加接近于未受损的细胞^[12-13]。Wang 等^[14] 给予 DN 小鼠吡格列酮治疗后发现, 其可以抑制肾脏的 AGE/AGE 受体轴并使核因子- κ B 表达下调, 同时检测到肾小球中的 NLRP3 及其下游的炎症细胞因子水平下降, 提示 NLRP3 炎性小体与糖尿病肾损害密切相关。Gao 等^[15] 发现在高糖诱导下, 足细胞中 TXNIP 促进了 NADPH 氧化酶及 NALP3 炎性小体的激活, 最终导致足细胞损伤, 阻断 TXNIP/NADPH 氧化酶信号可减轻高糖引发的细胞损伤。因此, 肾小球系膜细胞在高糖影响下 NLRP3 炎性小体表达增加, 而抑制 NLRP3 炎性小体及其相关蛋白可减轻高糖引发的不良影响, 这可能是治疗 DN 的新思路。

4.2 NLRP3 炎性小体对肾小管间质的影响 研究

显示,在高糖状态下,NLRP3炎性小体在肾小管上皮细胞和巨噬细胞、树突状细胞等免疫细胞中被激活并发挥作用^[5]。高血糖、高血脂可刺激肾小管上皮细胞嘌呤型受体P2X4的感受器,导致肾小管上皮细胞内脂质积聚、溶酶体功能障碍、氧化应激和管状功能障碍等,激活NLRP3炎性小体并分泌IL-1 β 和IL-18等,进而促进肾小管间质炎性反应的发生和发展^[16]。Chen等^[17]研究发现,在高糖刺激下,肾小管上皮细胞中NLRP3炎性小体通过嘌呤型受体P2X4被激活并调控IL-1 β 和IL-18的分泌与释放,而抑制NLRP3、caspase-1、IL-1 β 或P2X4受体能显著减轻肾小管上皮细胞的炎性反应。因此认为,肾小管上皮细胞产生的IL-1 β 和IL-18是微炎性反应状态的主要原因之一,对糖尿病及DN的发生有驱动作用^[18]。Wang等^[19]研究发现,存在于肾内树突状细胞及巨噬细胞中的NLRP3炎性小体,通过浸润白细胞及增强促炎因子的表达可促进炎性反应,而抑制肾小管上皮细胞中的IL-1 β 和IL-18可明显减轻肾小管间质的炎性反应。糖尿病患者血浆IL-1 β 和IL-18增多与炎性小体的活化及DN发生的关系十分密切,激活的NLRP3炎性小体由于促进了IL-1 β 和IL-18的分泌和释放,导致肾小管上皮细胞中的转化生长因子(TGF)- β 活化,进而抑制细胞周期中的G1期向S期转化,最终抑制细胞的分裂、增殖并促进肾组织纤维化。同时,TGF- β 还可促进细胞外基质生成,诱导自噬的发生^[20]。

5 NLRP3 炎性小体发挥作用的分子机制

DN作为一种炎症性疾病被多种炎症介质影响并受多种机制的调节,其中最重要的机制是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路。MAPK包括p38MAPK、细胞外信号调节激酶(ERK)和c-Jun氨基末端激酶(JNK)家族。NLRP3作为NOD2家族的一员可识别危险信号诱导的MAPK通路,并导致JNK、p38MAPK磷酸化水平降低和ERK的活化^[21]。

5.1 p38MAPK 通路 体外实验表明,高糖可以通过p38MAPK信号通路促进肾小球系膜细胞增殖、肥大,足细胞凋亡,同时使炎性细胞因子产生增多^[22]。Rajamäki等^[23]认为,p38MAPK的激活是NLRP3炎性小体活化并介导IL-1 β 分泌所必需的。高糖状态下,p38MAPK对IL-1 β 前体的合成以及IL-1 β 和IL-18的信号转导起重要作用,抑制p38MAPK通路可以延缓肾小球基底膜的增生并延

缓DN的进展^[22]。此外,NLRP3炎性小体被认为在多种肾组织损伤中有非经典的作用,p38MAPK和TGF- β 在肾小管上皮细胞中有明显的相互作用,通过促进炎症因子的释放而加重炎症反应^[24]。

5.2 ERK 通路 研究认为,ERK在DN起关键作用,其参与细胞的增殖、分化及基因转录和表达的调节。ERK介导的翻译后修饰可诱导NLRP3炎性小体去泛素化,并作为炎症反应中的启动事件^[25]。Sakai等^[26]认为,在活性氧簇、高血糖或生长因子等刺激下,ERK信号通路在足细胞和肾小球系膜细胞等中均可被激活。在高糖环境中,ERK通路使TGF- β 1表达增加,可促进肾小球系膜细胞增殖和肥大,最终导致肾小球硬化^[27]。

5.3 JNK 通路 研究发现,在应激或炎症因子作用下,NLRP3炎性小体主要激活JNK通路,JNK磷酸化后可促进胰岛素抵抗的发生和体内胰岛素水平发生改变,同时炎性细胞因子的表达发生变化,与DN的发生、发展相关^[28]。

研究已证实,多种复杂的免疫学和分子机制共同导致了DN的发生和发展,而炎症反应是众多机制中的关键环节,其中NLRP3炎性小体的研究最为广泛。目前,以IL-1 β 为靶点的定向治疗的临床试验已取得初步进展,针对炎性小体上游或下游的靶向药物也在进一步研究中。随着对NLRP3炎性小体研究的不断深入,为DN的防治提供了新思路和新方法。

参 考 文 献

- [1] 徐光标,陈德君,陈伟珍.雷公藤多苷片对糖尿病肾病患者临床疗效及炎症因子水平影响研究[J].中华中医药学刊,2017,35(8):2206-2208. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.08.079.
- [2] 罗昭强,何隆.玉泉丸对2型糖尿病肾病患者血清炎症因子、 β 2微球蛋白和VEGF、IGF-1的影响[J].中医药导报,2017,23(15):106-108. DOI:10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2017.15.034.
- [3] Qiu YY,Tang LQ.Roles of the NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J].Pharmacol Res,2016,114:251-264. DOI:10.1016/j.phrs.2016.11.004.
- [4] Segovia J,Sabbah A,Mgbemena V,et al.TLR2/MyD88/NF- κ B pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection[J].PLoS One,2012,7(1):e29695. DOI:10.1371/journal.pone.0029695.
- [5] Hutton HL,Ooi JD,Holdsworth SR,et al.The NLRP3 inflamma-

- some in kidney disease and autoimmunity[J]. *Nephrology* (Carlton), 2016, 21(9): 736-744. DOI: 10.1111/nep.12785.
- [6] Huang W, Gou F, Long Y, et al. High glucose and lipopolysaccharide activate NOD1-RICK-NF- κ B inflammatory signaling in mesangial cells[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124(8): 512-517. DOI: 10.1055/s-0042-105641.
- [7] Bai H, Yang B, Yu W, et al. Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(1): 180-187. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.11.015.
- [8] Mirza RE, Fang MM, Weinheimer-Haus EM, et al. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in type 2 diabetic humans and mice[J]. *Diabetes*, 2014, 63(3): 1103-1114. DOI: 10.2337/db13-0927.
- [9] Feng H, Gu J, Gou F, et al. High glucose and lipopolysaccharide prime NLRP3 inflammasome via ROS/TXNIP pathway in mesangial cells[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 6973175. DOI: 10.1155/2016/6973175.
- [10] Boini KM, Xia M, Koka S, et al. Instigation of NLRP3 inflammasome activation and glomerular injury in mice on the high fat diet: role of acid sphingomyelinase gene[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 19031-19044. DOI: 10.18632/oncotarget.8023.
- [11] Abais JM, Zhang C, Xia M, et al. NADPH oxidase-mediated triggering of inflammasome activation in mouse podocytes and glomeruli during hyperhomocysteinemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(13): 1537-1548. DOI: 10.1089/ars.2012.4666.
- [12] Gao P, Meng XF, Su H, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2448-2460. DOI: 10.1016/j.bbamer.2014.07.001.
- [13] Shahzad K, Bock F, Dong W, et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2015, 87(1): 74-84. DOI: 10.1038/ki.2014.271.
- [14] Wang Y, Yu B, Wang L, et al. Pioglitazone ameliorates glomerular NLRP3 inflammasome activation in apolipoprotein E knockout mice with diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181248. DOI: 10.1371/journal.pone.0181248.
- [15] Gao P, He FF, Tang H, et al. Erratum to "NADPH oxidase-induced NALP3 inflammasome activation is driven by thioredoxin-interacting protein which contributes to podocyte injury in hyperglycemia"[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 1213892. DOI: 10.1155/2016/1213892.
- [16] Rampanelli E, Ors   E, Ochodnický P, et al. Metabolic injury-induced NLRP3 inflammasome activation dampens phospholipid degradation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2861. DOI: 10.1038/s41598-017-01994-9.
- [17] Chen K, Zhang J, Zhang W, et al. ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5): 932-943. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.009.
- [18] Wang F, Huang L, Peng ZZ, et al. Losartan inhibits LPS + ATP-induced IL-1 β secretion from mouse primary macrophages by suppressing NALP3 inflammasome[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(9): 680-684.
- [19] Wang J, Wen Y, Lv LL, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in angiotensin II-induced NLRP3 inflammasome activation in human renal proximal tubular cells *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(7): 821-830. DOI: 10.1038/aps.2015.21.
- [20] Loboda A, Sobczak M, Jozkowicz A, et al. TGF- β 1/smads and miR-21 in renal fibrosis and inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 8319283. DOI: 10.1155/2016/8319283.
- [21] Liao PC, Chao LK, Chou JC, et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1 β secretion[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(1): 89-96. DOI: 10.1007/s00011-012-0555-2.
- [22] M  ller R, Daniel C, Hugo C, et al. The mitogen-activated protein kinase p38 α regulates tubular damage in murine anti-glomerular basement membrane nephritis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56316. DOI: 10.1371/journal.pone.0056316.
- [23] Rajam  ki K, M  yr  np    MI, Risco A, et al. p38 δ MAPK: a novel regulator of NLRP3 inflammasome activation with increased expression in coronary atherogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(9): 1937-1946. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.307312.
- [24] Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(1): 41-48. DOI: 10.1093/ndt/gft332.
- [25] Ghonime MG, Shamaa OR, Das S, et al. Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function[J]. *J Immunol*, 2014, 192(8): 3881-3888. DOI: 10.4049/jimmunol.1301974.
- [26] Sakai N, Wada T, Furuichi K, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45(1): 54-65.
- [27] Wan-Xin T, Tian-Lei C, Ben W, et al. Effect of mitofusin 2 overexpression on the proliferation and apoptosis of high-glucose-induced rat glomerular mesangial cells [J]. *J Nephrol*, 2012, 25(6): 1023-1030. DOI: 10.5301/jn.5000089.
- [28] Pastor F, Dumas K, Barthélémy MA, et al. Implication of REDD1 in the activation of inflammatory pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7023. DOI: 10.1038/s41598-017-07182-z.

(收稿日期: 2017-11-10)