

· 综述 ·

糖尿病视网膜病变与 NLRP3 炎性小体

杨可来¹ 匡洪宇²¹深圳大学总医院内分泌代谢病科,深圳 518000; ²哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科,哈尔滨 150000

通信作者:匡洪宇,Email:ydykuanghongyu@126.com

【摘要】 糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病常见的微血管并发症,是世界范围内致盲的主要原因。研究表明,NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体相关的炎性反应在 DR 的发病机制中起重要作用。NLRP3 炎性小体是一种大型蛋白复合物,可被三磷酸腺苷(ATP)、活性氧(ROS)、前列腺素 E2 等上游分子调控并激活,并促进下游白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的分泌、释放并触发炎性反应。通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活改善高血糖相关的视网膜损伤,可为 DR 的防治提供新思路。

【关键词】 糖尿病视网膜病变;NLRP3 炎性小体;炎症

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20211214-12033

NLRP3 inflammasome and diabetic retinopathy Yang Kelaier¹, Kuang Hongyu². ¹Department of Endocrinology and Metabolism, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen 518000, China; ²Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, China

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

【Abstract】 Diabetic retinopathy (DR) is a common microvascular complications of diabetes mellitus, which is the main cause of blindness worldwide. Studies have shown that NLRP3 inflammasome-related inflammatory responses play an important role in the pathogenesis of DR. NLRP3 inflammasome is a large protein complex that is regulated and activated by upstream molecules such as ATP, ROS, and prostaglandin E2(PGE2) to promote the secretion and release of downstream interleukin (IL)-1 β and IL-18 and trigger inflammatory responses. Inhibition the activation of NLRP3 inflammasome and improve the retinal injury associated with hyperglycemia, can provide new ideas for the prevention and treatment of DR.

【Keywords】 Diabetic retinopathy; NLRP3 inflammasome; Inflammation

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20211214-12033

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病常见的微血管并发症之一,是世界范围内致盲的主要原因。DR 早期为非增殖期 DR(NPDR),通过眼底照相可发现微动脉瘤、出血及渗出等视网膜病变,如患者不能得到及时有效的控制则逐渐发展为增殖期 DR(PDR),PDR 以新生血管生成为主要特点^[1]。DR 的发生发展有多种机制参与,包括糖基化终末产物形成和蓄积、多元醇代谢通路激活、氧化应激等。其中炎性反应是众多机制中的核心环节,近年来对炎性小体的研究逐渐增多。炎性小体是一种存在细胞浆内,能够识别多种病原微生物及内源性信号分子,并在固有免疫中发挥重要作用的多蛋白复合物。其中,NOD 样家族中的 NOD 样蛋白(NLRP)3 炎性小体是目前研究最广泛的炎性小体之一,且与

DR 的发生发展关系密切。本文主要就 NLRP3 炎性小体及其在 DR 中的作用及机制进行概述。

1 NLRP3 炎性小体

1.1 NLRP3 炎性小体的结构 NLRP3 炎性小体是由核心蛋白 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和效应蛋白 caspase-1 组成的大型蛋白复合物。NLRP3 在炎性小体中起核心作用,包含 3 个结构域:负责识别病原微生物的富含亮氨酸重复域(LRR)位于 C-末端;负责活化的 NLRP3 的中心核苷酸寡聚结构域(NACHT)位于中心区域;介导信号转导的效应 PYRIN 域位于 N-末端,包括热蛋白结构域(PYD)、杆状病毒凋亡抑制重复结构域及胱天蛋白酶募集结构域(CARD)。ASC 是连接 NLRP3 并募集 caspase-1 前体的连接蛋白,由 PYD 和 CARD

两部分组成,在外源性或内源性信号的刺激下,通过 PYD-PYD 结构域与上游的 NLRP3 蛋白相互作用,通过 CARD-CARD 结构域招募下游的靶蛋白 caspase-1 前体。Caspase-1 前体可诱导白细胞介素 (IL)-1 β 前体和 IL-18 前体成熟,促进 IL-1 β 和 IL-18 的释放并调节机体免疫应答^[2]。NLRP3 炎性小体活化并发挥作用需要“启动”和“激活”两个步骤。

1.2 NLRP3 炎性小体的启动 在静息状态下,激活信号不足以活化 NLRP3 炎性小体,在此阶段启动信号可以通过转录依赖途径和非转录依赖途径调节 NLRP3 炎性小体的激活。转录启动信号可通过识别病原相关分子模式 (PAMPs) 或损伤相关分子模式 (DAMPs) 诱导结合模式识别受体,上调 NLRP3、caspase-1 和 pro-IL-1 β 的表达,导致核因子 (NF)- κ B 活化和基因转录。非转录启动信号最近也被报道,在快速启动过程中,脂多糖可增强 NLRP3 炎性小体激活并介导快速转录非依赖性启动。另外,启动过程可诱导 NLRP3 的翻译后修饰,包括泛素化、磷酸化和磺酰化,将 NLRP3 稳定在一个激活信号充足但自动抑制的非激活状态,NLRP3 的翻译后修饰可在非刺激、启动、激活多个阶段被观察到^[3]。

1.3 NLRP3 炎性小体的激活 NLRP3 炎性小体的激活阶段包括炎性小体复合物的组装和下游效应蛋白的水解过程。多种固相颗粒、细菌、病毒、真菌,甚至温度的剧烈变化都可以触发炎性小体的激活。目前已经发现 NLRP3 炎性小体激活的多种模型,包括离子重分布模型、溶酶体破坏模型、线粒体功能障碍模型、代谢变化模型和反式高尔基体分解模型。

1.3.1 离子重分布模型 离子重分布模型主要包括 K⁺外流、Ca²⁺内流和 Cl⁻外流。K⁺载体和三磷酸腺苷 (ATP) 介导的嘌呤能配体门控离子通道 7 受体 (P2X7R) 是嘌呤能受体家族中的配体门控离子通道,作为促炎性反应信号的主要传感器,在静息状态和活动状态下定位于质膜下区域的离散点,通过 K⁺外流和 Ca²⁺内流促进 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,发挥 ATP 的感应接收作用并介导炎症反应^[2]。

1.3.2 溶酶体破坏模型 近年来溶酶体失稳相关的 NLRP3 炎性小体信号通路备受关注。溶酶体中的组织蛋白酶在微粒的刺激下,使溶酶体酸化、肿胀、损伤而激活 NLRP3 炎性小体。在糖尿病小鼠模

型中发现尿酸可通过促进溶酶体破裂而激活 NLRP3 炎性小体,降尿酸药物可使小鼠表现出较低水平的 IL-1 β 、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 NLRP3^[4]。在体外模型中发现溶酶体破坏剂可使入脐静脉细胞中 NLRP3、IL-1 β 、IL-6 和 IL-18 表达增加,并促进 K⁺外流和 Ca²⁺内流,表明溶酶体失稳可激活 NLRP3 炎性小体^[5]。

1.3.3 线粒体功能障碍模型 线粒体功能障碍和释放到细胞质中的线粒体活性氧 (ROS) 增多是 NLRP3 炎性小体激活中的重要上游事件。在氧化应激因素的刺激下,线粒体可通过 ROS 和 Ca²⁺共同打开线粒体通透性转换孔道作为 NLRP3 炎性小体组装的对接位点;当线粒体功能失调时,可被有丝分裂吞噬清除,线粒体 ROS 释放减少,在 NLRP3 炎性小体的激活过程中起抑制作用^[6]。

1.3.4 代谢变化模型 NLRP3 炎性小体可被饮食或上调的游离脂肪酸合成而激活。单磷酸腺苷依赖的蛋白激酶是脂肪酸代谢的重要介质,通过限制 ROS 的产生和激活自噬,抑制 NLRP3 炎性小体的激活。此外,代谢变化也可对 NLRP3 炎性小体产生负性调节。禁食和限制热量摄入可以促进新陈代谢发生脂肪酸氧化,导致酮体产生增多,尤其多种刺激物诱导的 β -羟基丁酸增加可抑制 NLRP3 炎性小体活化^[7]。

1.3.5 反式高尔基体分解模型 研究发现,NLRP3 可通过胆固醇调节元件结合蛋白 2 转位至高尔基体,细胞内的反式高尔基体网络可通过磷脂酰肌醇-4-磷酸招募 NLRP3,促进下游 ASC 的寡聚化和 NLRP3 炎性小体的组装^[8]。

2 NLRP3 炎性小体在 DR 中的作用及机制

DR 作为糖尿病重要的并发症之一,可导致患者严重的视力损害和失明,持续的高血糖损伤视网膜血管系统内稳态和血-视网膜屏障 (BRB) 的破坏是 DR 的主要促进因素。其中,视网膜微血管炎症、新生血管和 BRB 的通透性异常是 DR 损害的普遍靶点,在高血糖过程中,视网膜微血管内皮细胞功能障碍是多因素病因和发病机制的启动者,表现为细胞暴露于晚期糖基化终末产物后细胞迁移和凋亡的共同作用,并受多种炎症和凋亡因子调控^[9]。在 DR 患者中,PDR 患者中 NLRP3、IL-1 β 和 IL-18 的表达明显高于 NPDR 患者,牵拉性视网膜脱离患者的 NLRP3 表达明显高于视网膜完整的患者。在啮齿动物模型中,糖尿病大鼠视网膜中 NLRP3 炎性

小体及其下游炎性因子的表达升高,且阻断 NLRP3 可使 caspase-1、IL-1 β 、IL-18、caspase-3 和 VEGF 的表达下降且对 BRB 的完整性具有改善作用^[9];同样在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠视网膜中,NLRP1 和 NLRP3 的表达均增加,在 2 型糖尿病大鼠模型中,经过 10 周高脂饮食喂养的大鼠视网膜中 NLRP3 显著增加,后来发现它与人视网膜内皮细胞中的硫氧还原蛋白结合蛋白(TXNIP)结合形成免疫沉淀^[10]。

同时有研究证实,视网膜中的多种细胞表达 NLRP3,且在 DR 发病过程中起关键作用。人视网膜微血管内皮细胞经高糖或糖基化终末产物处理后,NLRP3 炎性小体及其下游 IL-1 β 、IL-18 均显著增高,抑制 NLRP3 后细胞的超微结构损伤减轻,且凋亡及迁移相关蛋白的表达也明显改善^[9]。使用 20 mM 葡萄糖刺激小鼠视网膜神经节细胞,48 h 后 NLRP3 表达显著上调^[11],NLRP3 抑制剂 MCC950 可通过下调 NEK7-NLRP3 的相互作用,从而减少 IL-1 β 的产生。视网膜色素上皮细胞参与 BRB 的形成,在使用 15 mM 葡萄糖和 IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 联合培养 24 h 后,细胞中 NLRP3 染色斑点增加,而用连接蛋白 43 半通道阻断剂处理后 NLRP3 染色斑点显著减少^[12]。

2.1 NLRP3 炎性小体在 DR 中的上游激活因子

2.1.1 ATP ATP 是 NLRP3 炎性小体重要的激活物之一,在“启动”和“激活”阶段都发挥作用。在离子重分布模型中,ATP 可以在缝隙连接蛋白 43 (Cx43)中自由通过,介导 P2X7R 调节 K⁺ 外流和 Ca²⁺ 内流并促进 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,同时,IL-1 β 和 IL-18 可正反馈触发细胞膜上 Cx43 半通道的开放和 NLRP3 炎性小体激活。在高血糖或缺氧的条件下,半通道打开形成膜性孔隙^[13],促进 ATP 流出,并自分泌激活 NLRP3 炎性小体。在 DR 模型中阻断 Cx43 半通道后,通过半通道的 ATP 减少,可使 NLRP3 炎性小体及促炎细胞因子、VEGF 的水平显著降低^[12]。

2.1.2 ROS 内源性或外源性的危险信号使视网膜细胞中的线粒体活性增强并产生 ROS。ROS 通过抗氧化剂硫氧还原蛋白(TRX)上的二硫键,结合并激活硫氧还原蛋白结合蛋白(TXNIP)。游离的 TXNIP 可减弱 TRX 对 ROS 的清除能力,并通过结合 NLRP3 的 LRRs 激活 NLRP3 炎性小体。TXNIP 在糖尿病患者的视网膜中表达显著增加,抑制或阻

断 ROS 或 TXNIP 表达可使 NLRP3 炎性小体表达减弱并抑制 IL-1 β 前体和 IL-18 前体转化^[14]。研究发现,转录因子 E2 相关因子(Nrf)-2 是常见的调节 ROS-NLRP3 炎性小体通路的转录因子,通过与抗氧化反应元件结合而调节抗氧化剂的转录,减弱 NLRP3 炎性小体的表达,对 DR 产生保护作用^[15]。NIMA 相关蛋白激酶(NEK)-7 在线粒体中 ROS 诱导下可与 NLRP3 的 LRRs 结合,通过 ROS-NLRP3 炎性小体通路促进 DR 的发生发展^[16]。

2.1.3 前列腺素 E2(PGE2) PGE2 是一种花生四烯酸的代谢产物,PGE2 及其合成的限速酶环氧合酶(COX)-2 在 DR 患者的玻璃体中表达明显升高。在 DR 中,PGE2 的水平与 VEGF 呈正相关,并促进白细胞黏附、新血管形成、视网膜血管损伤和细胞凋亡^[13]。Wang 等^[17] 向糖尿病大鼠玻璃体腔中注射 PGE2 后发现大鼠视网膜血管渗漏和内皮细胞凋亡,给予 PGE2 受体抑制剂后上述表现得到改善,同时检测到 NLRP3、caspase-1、ASC 和 VEGF 的表达下降。给予 PGE2 受体拮抗剂后,PGE2 的作用可能由于 NLRP3 与 ASC 低聚物的抑制作用而减弱^[14]。

2.2 NLRP3 炎性小体在 DR 中的下游效应因子

2.2.1 IL-1 β IL-1 β 是一种经典的促炎细胞因子。在 DR 患者的视网膜中,大量 caspase-1 和 IL-1 β 聚集于 Müller 细胞,并以旁分泌的方式影响邻近细胞。Caspase-1 在高糖的刺激下促进 IL-1 β 前体转化成活性的 IL-1 β ,促进辅助性 T 细胞 17 的分化、增强嗜酸性粒细胞的细胞毒性作用等。同时在高糖的诱导下,IL-1 β 可通过自分泌方式增加 caspase-1 的浓度,形成正反馈循环引起机体的炎性反应,同时也可诱导细胞产生信号素 3A,激活 caspase-3 导致细胞凋亡^[18]。

2.2.2 IL-18 IL-18 是由单核细胞产生的多效细胞因子,关于 IL-18 对 DR 的作用,文献报道了不同观点。Shen 等^[19] 认为 IL-18 具有抗血管生成的作用,IL-18 可通过阻止紧密连接蛋白 Claudin-5 的减少来保护 BRB。Hirano 等^[20] 认为在视网膜黄斑变性的小鼠模型中,IL-18 可能促进了脉络膜新生血管的形成。因此,对于 IL-18 在 DR 中的作用还需进一步研究讨论。

2.3 NLRP3 炎性小体可作为 DR 治疗的新靶点 目前临床上应用抗 VEGF 治疗、激光治疗和玻璃体切除术等方法治疗 DR,但仍然被认为不足。随着近几年对于炎性反应特别是 NLRP3 炎性小体的研

究逐渐增多,发现许多天然肽类(槲皮素、松弛素等)、临床药物(非诺贝特、维拉帕米等)及营养素(1,25-二羟基维生素 D、叶酸等)等可通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活,改善高血糖相关的视网膜损伤。因此抑制 NLRP3 炎性小体可为 DR 的防治提供新思路^[9-10]。

3 小结

综上所述,多种机制参与 DR 的发生发展,其中 NLRP3 炎性小体相关的炎性反应十分重要。目前 DR 的治疗方法仍不甚理想,为减轻高血糖所致的视力损伤,NLRP3 炎性小体相关的靶向药物具有进一步研究的价值,可为 DR 的防治提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Roy S, Kim D. Retinal capillary basement membrane thickening: role in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 82: 100903. DOI: 10. 1016/j. preteyer. 2020. 100903.
- [2] Xu Z, Chen ZM, Wu X, et al. Distinct molecular mechanisms underlying potassium efflux for NLRP3 inflammasome activation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 609441. DOI: 10. 3389/fimmu. 2020. 609441.
- [3] Han X, Sun S, Sun Y, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease [J]. *Autophagy*, 2019, 15 (11): 1860-1881. DOI: 10. 1080/15548627. 2019. 1596481.
- [4] Thounaojam MC, Montemari A, Powell FL, et al. Monosodium urate contributes to retinal inflammation and progression of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2019, 68 (5): 1014-1025. DOI: 10. 2337/db18-0912.
- [5] Katsnelson MA, Lozada-Soto KM, Russo HM, et al. NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311 (1): C83-C100. DOI: 10. 1152/ajpcell. 00298. 2015.
- [6] Zhong Z, Liang S, Sanchez-Lopez E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 560 (7717): 198-203. DOI: 10. 1038/s41586-018-0372-z.
- [7] Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, et al. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (3): 263-269. DOI: 10. 1038/nm. 3804.
- [8] Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 564 (7734): 71-76. DOI: 10. 1038/s41586-018-0761-3.
- [9] Yang K, Liu J, Zhang X, et al. H3 relaxin alleviates migration, apoptosis and pyroptosis through P2X7R-mediated nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 inflammasome activation in retinopathy induced by hyperglycemia [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 603689. DOI: 10. 3389/fphar. 2020. 603689.
- [10] Liu Q, Zhang F, Zhang X, et al. Fenofibrate ameliorates diabetic retinopathy by modulating Nrf2 signaling and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 445 (1-2): 105-115. DOI: 10. 1007/s11010-017-3256-x.
- [11] Hu L, Yang H, Ai M, et al. Inhibition of TLR4 alleviates the inflammation and apoptosis of retinal ganglion cells in high glucose [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 255 (11): 2199-2210. DOI: 10. 1007/s00417-017-3772-0.
- [12] Mugisho OO, Green CR, Kho DT, et al. The inflammasome pathway is amplified and perpetuated in an autocrine manner through connexin43 hemichannel mediated ATP release [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862 (3): 385-393. DOI: 10. 1016/j. bbagen. 2017. 11. 015.
- [13] Raman KS, Matsubara JA. Dysregulation of the NLRP3 inflammasome in diabetic retinopathy and potential therapeutic targets [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2022, 30 (2): 470-478. DOI: 10. 1080/09273948. 2020. 1811350.
- [14] Liu S, Tang G, Duan F, et al. MiR-17-5p inhibits TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway and suppresses pancreatic β -cell pyroptosis in diabetic mice [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 768029. DOI: 10. 3389/fcvm. 2021. 768029.
- [15] Cao Y, Li X, Wang CJ, et al. Role of NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of l-carnitine against high glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69: 345-348. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2014. 12. 030.
- [16] Zhang Y, Lv X, Hu Z, et al. Protection of Mcc950 against high-glucose-induced human retinal endothelial cell dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (7): e2941. DOI: 10. 1038/cddis. 2017. 308.
- [17] Wang M, Wang Y, Xie T, et al. Prostaglandin E2/EP2 receptor signalling pathway promotes diabetic retinopathy in a rat model of diabetes [J]. *Diabetologia*, 2019, 62 (2): 335-348. DOI: 10. 1007/s00125-018-4755-3.
- [18] Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 66 (5): 1037-1046. DOI: 10. 1016/j. jhep. 2017. 01. 022.
- [19] Shen J, Choy DF, Yoshida T, et al. Interleukin-18 has anti-permeability and antiangiogenic activities in the eye: reciprocal suppression with VEGF [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229 (8): 974-983. DOI: 10. 1002/jcp. 24575.
- [20] Hirano Y, Yasuma T, Mizutani T, et al. IL-18 is not therapeutic for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Nat Med*, 2014, 20 (12): 1372-1375. DOI: 10. 1038/nm. 3671.

(收稿日期:2021-12-14)