

细胞焦亡在结核分枝杆菌中研究进展

赵悦颖*, 杜先智#

重庆医科大学附属第二医院, 重庆

收稿日期: 2021年11月27日; 录用日期: 2021年12月17日; 发布日期: 2021年12月30日

摘要

焦亡是一种新兴的细胞内在死亡机制, 是一种通过依靠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)家族的促炎细胞死亡模式, 当外来信号刺激被感染细胞时, 模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)被自动激活并参与形成炎性小体(NLRP3小体), NLRP3小体特异性识别切割半胱氨酸天冬氨酸(Pro caspase-1/4/5/11)形成成熟的半胱氨酸天冬氨酸, 继而作用于Gasdermin-D蛋白将其分子的GSDMD-N端解聚嵌入细胞膜上形成内径10~15 nm非选择性孔洞, 导致细胞渗透肿胀和裂解坏死, 同时将活化的致炎因子白细胞介素-1 β 和IL-18释放到胞外, 并募集更多的炎症细胞以此扩大炎症反应。本文就细胞焦亡的分子机制及调控结核分枝杆菌感染后巨噬细胞焦亡的影响因子进行综述。

关键词

结核分枝杆菌, 巨噬细胞, 细胞焦亡

Research Progress of Pyroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*

Yueying Zhao*, Xianzhi Du#

The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Nov. 27th, 2021; accepted: Dec. 17th, 2021; published: Dec. 30th, 2021

Abstract

Pyroptosis is an emerging mechanism of intracellular death. It is a pro-inflammatory cell death mode that relies on the cysteine aspartate protease (caspase) family. When the infected cells are stimulated by foreign signals, pattern recognition receptor (PRR) is automatically activated and participates in the formation of inflammasome (NLRP3 body), which specifically recognizes and

*第一作者。

#通讯作者。

clews Pro caspase-1/4/5/11 to form mature caspase. Then, it acts on Gasdermin-D protein to embed the GSDMD-N terminal of its molecule into the cell membrane to form a non-selective hole with an inner diameter of 10~15 nm, resulting in cell infiltration swelling and lysis necrosis. Meanwhile, it releases the activated inflammatory cause interleukin-1 β and IL-18 into the extracellular space, and recruits more inflammatory cells to expand the inflammatory response. This article reviews the molecular mechanism of pyroapoptosis and the influencing factors of macrophage pyroapoptosis after mycobacterium tuberculosis infection.

Keywords

Mycobacterium tuberculosis, Macrophage, Pyroptosis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

巨噬细胞吞噬结核分枝杆菌后发生焦亡坏死, 活化的 caspase-1/-4/-5 或-11 发生裂解和促炎细胞因子白细胞介素-1 β 和 IL-18 的释放出细胞外, 引起炎症反应[1]。研究结核分枝杆菌细胞发生焦亡的调控机制, 可进一步理解结核病的病理生理。

2. 细胞焦亡在结核分枝杆菌中作用机制

细胞焦亡分为经典和非经典途径[2], 在经典炎症反应激活中, 当外来信号刺激被感染细胞时, 细胞内的 NLRP3 小体(核苷酸结合寡聚结构域样受体家族)被自动激活形成, 活化的 NLRP3 小体参与识别切割并激活 Pro caspase-1 前体, 形成成熟的 Caspase-1 [3], Caspase-1 通过识别切割 gasdermin (GSDMD) 蛋白, 将具有诱导焦亡活性 GSDMD-N 端从 GSDMD C 端解聚分离[4], 通过寡聚化会在细胞膜上形成具有膜孔活性的 N-端结构域。同时促进白细胞介素-1 β 和 IL-18 的活化以及释放, 同时募集到更多的炎性分子, 以此放大免疫介导的炎性反应。研究证明, 结核分枝杆菌感染人体后, 产生的是非经典焦亡途径[5]。当结核分枝杆菌入侵巨噬细胞后, TLRs-TRIF-IFN β 信号通路被激活, Toll 阳受体如 TLR4, 通过识别结核分枝杆菌胞壁上具有抗原活性的脂多糖(LPS)进入细胞内, 结合胞内配体蛋白 TRIF 招募 TRAM 蛋白。TRAM 蛋白参与调节该信号转导通路后, 由配体蛋白 MyD88 和 TRIF 感受信号并运输内涵体的 TLRs 至 TRAF3 并与之结合, 从而分别激活 IRF7/IRF3 调节因子, 上调 I 型干扰素(type I IFN)的表达, 而后者则可以通过增加细菌的翻译从而增加 caspase-11 前体(pro-caspase-11)数量[6]。LPS 进入胞内可以直接结合 pro-caspase-11 的 CARD 区域并激活 caspase-11, 活化的 caspase-11 通过切割 pannexin-1 的胞质区打开 pannexin-1 通道(一种细胞膜上的 ATP 通道), ATP 外流形成膜内外 ATP 能量差, 促进胞内钾离子向胞外流动, 外流的钾离子促进 NLRP3 炎性小体的组装与活化, 活化的 NLRP3 小体通过自身的寡聚化与接头蛋白 ASC 结合形成 ASC 斑点(ASCspeck) [7]。ASC 斑点招募并完成对 pro-caspase-1 切割形成成熟的 caspase-1, 在成熟的 caspase-1 介导下, pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 分裂形成产生坏死活性的 IL-1 β 和 IL-18 并释放到细胞外进而发生细胞焦亡坏死。

2.1. Miro-20b 通过靶向 NLRP3 抑制结核分枝杆菌焦亡

巨噬细胞被结核分枝杆菌感染后, 巨噬细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体吡啶结构域含蛋白 3

(NLRP3)炎症小体被激活[8]。NLRP3 是巨噬细胞焦亡中的重要调节因子, 是 NLRP 家族中最具特征的成员之一。当细胞应激信号出现时, 它可能被激活, NLRP3 炎症小体激活可导致巨噬细胞线粒体相关信号中断、氧化损伤甚至焦亡。抑制 NLRP3 小体激活可以减轻巨噬细胞发生焦亡坏死和炎症因子释放导致的组织损伤[9]。巨噬细胞作为结核分枝杆菌感染力最主要的机体免疫细胞, 不仅参与了细胞免疫, 还表现出高度的异质性和可塑性。在不同感染阶段, 巨噬细胞可以分化为特异 M1 和 M2 巨噬细胞, 在结核分枝杆菌感染早期主要向 M1 方向极化, M1 巨噬细胞被证实与促炎细胞因子分泌和杀微生物能力相关, 引起巨噬细胞炎症; 而 M2 巨噬细胞在 TB 患者中发挥抗炎作用, 并与 M1 巨噬细胞共存[10]。新的研究表明, miR-144、miR-29a、miR-21、miR-146、miR-34 等 miRNAs 在 TB 患者的 T 细胞和巨噬细胞中发生了显著的改变, 并显示出潜在的影响免疫功能的潜能。其中的 miR-20b 能够直接与 NLRP3 结合, 抑制 NLRP3 炎症小体激活进而抑制 NLRP3/caspase-1/IL-1 β 通路, 促进巨噬细胞向 M2 极化, 从而抑制炎症反应。同样在实验组被注入 miR-20b 小鼠体内, 可以检测到 procaspase1 降低, 这表明 miR-20b 对 caspase1 的影响不仅在炎症激活水平上, 而且在转录水平上。研究者猜想可能与病变部位缺氧有关, HIF-1 α 可在损伤组织中诱导缺氧反应, 进而转录调控 caspase1 等多种基因。miR-20b 可以靶向调控 HIF-1 α 从而抑制 procaspase1 转录[11]。

2.2. NSA 通过抑制 GSDMD-N 端的寡聚抑制结核分枝杆菌焦亡

GSDMD 属于 gasdermin 蛋白家族, 该家族蛋白端分为具有焦亡活性的 N 端和抑制焦亡活性的 C 端。研究发现, GSDMD 是细胞焦亡经典和非经典途径的共同通路的操作蛋白, 当活性 NLRP3 小体切割激活形成成熟的半胱天冬氨酸(caspase-1/4/5/11)作用于 GSDMD, 将 GSDMD-N 端从 GSDMD-C 端解聚分离出来, 从而使 GSDMD-N 端单体通过自身脂质成分与细胞膜上的脂质镶嵌结合, 形成环状聚合物, 该物质可自身扩展, 在细胞膜上形成内径 10~15 nm 的非选择性孔道[12]。当细胞膜上出现许多的膜孔后, 细胞内的小分子物质如离子化合物, 通过孔洞顺浓度梯度流入胞外, 胞外水分流入胞内, 造成细胞肿胀、甚至裂解最终不可逆的破裂死亡。同时激活的炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 可通过该孔洞释放到胞外, 放大免疫炎症反应。GSDMD-N 端能特异性识别酸性脂质 Necrosulfonamide (NSA), 它是一种小分子化合物, 当与 GSDMD 特异识别结合后, 通过抑制抑制 GSDMD-N 端的寡聚, 导致无法形成细胞膜孔, 从而在体内和体外实验中能直接阻止结核分枝杆菌发生细胞焦亡。

2.3. RCC36 抑制炎性小体的表达逃避免疫清除

结核病作为长期处于全球高发病率、高死亡率的传染病种, 尚未得到有效控制, 与其结核菌耐药性产生, 结核病人通常自身免疫力低下, 未得到规范化诊疗相关外; 更重要原因在结核分枝杆菌可长期潜伏在巨噬细胞体内, 并通过产生免疫逃逸机制逃逸免疫监控和清除[13]。NLRP3 炎性小体的活化可分为信号起始和激活阶段。在静息未活化状态下处于低表达状态, 在接收到细胞外高钾离子信号刺激时, 通过 NF- κ B 信号通路促进 NLRP3 小体磷酸化, 转录形成 NLRP3mRNA, 再进行翻译及翻译后加工等, 此过程称为 NL-RP3priming, 也是 NLRP3 炎性激活的第一个信号分子; NLRP3 在 priming 阶段发生去泛素化, BRC36 作为其中参与介导的去泛素化酶家族的重要成员, 是一种含有 JAMM 构域的锌离子依赖的金属蛋白酶 1 (zinc-dependent metalloprotease-1, Zmp1), 属于细菌性病原体的毒力因子。结核分枝杆菌中也含有相应的 Zmp1, 是一种和中性锌离子结合的金属蛋白酶, 由 Rv0198c 基因转录表达, 属于脑啡肽酶家族(NEP; M13)。强毒性结核分枝杆菌通过 Zmp1 调控干扰一种称为 inflammasome 的多蛋白复合物的激活, 抑制 priming 过程中 NLRP3 去泛素化, 抑制 NLRP3 表达及进一步活化, 从而导致依赖活化 NLRP3 小体诱导受感染巨噬细胞内 Pro Caspase1 切割激活, 从而抑制 GSDMD-N 端诱导的胞膜孔洞形成和炎性

因子的释放。相反, Zmp1 缺失的结核分枝杆菌细胞, 被巨噬细胞吞噬后促进 NLRP3 小体激活和细胞炎性因子的释放, 机体对结核分枝杆菌杀伤力增强。另外, 有研究表明, Zmp1 参与结核分枝杆菌细胞壁的合成代谢, Zmp1 基因缺失或突变可以影响结核分枝杆菌抗原的表达[14]。

2.4. 结核分枝杆菌感染过程中 ESX-1 表达和 K⁺外流促进 NLRP3 激活

NLRP3 是巨噬细胞发生焦亡的首要信号分子, 而 NLRP3 的激活和炎性坏死依赖于 VII 型分泌系统 6-kDa 早期分泌抗原靶(ESAT-6)分泌系统 1 (ESX-1)。ESX-1 分泌一系列的蛋白质底物, 这些底物将通过结核分枝杆菌的转运蛋白转运到胞质中介导吞噬体通透性。吞噬体通透性损伤可能允许结核分枝杆菌 DNA 的释放和 AIM2 的激活, 吞噬体损伤是 NLRP3 激活的先决条件。ESX-1 分泌系统的主要影响之一是吞噬体膜的失稳, 通过介导吞噬体的通透性将细菌效应物转移至可被感染的巨噬细胞中, 该特性表达可促进包括炎性小体在内的模式识别受体激活。研究证实, 钾离子外流即是活化 NLRP3 小体的先决条件, 又是巨噬细胞受到 NLRP3 小体刺激后产生的应答反应。当 GSDMD 在胞膜上形成非选择性孔道后, 胞内的 ATP 可通过流入细胞外, P2X 配体门控阳离子通道 7 (P2X7), 胞内的钾离子可通过该通道大量流出细胞外, 从而导致 NLRP3 炎性体的激活[15], 但钾离子对 NLRP3 小体的激活机制仍不十分清楚。

3. 结语与展望

细胞焦亡作为一种细胞主动的病理性死亡, 通过细胞受到外来刺激时诱导自身内部产生炎症因子级联反应, 最终导致细胞肿胀甚至裂解死亡, 产生机体自我防御作用。然而, 过量炎症因子通过裂解的巨噬细胞释放到细胞外, 产生炎症风暴, 导致免疫系统过度激活从而攻击正常的组织和细胞。因此通过开展结核分枝杆菌感染后的巨噬细胞作用及调控机制研究, 对疾病的发生、发展和转归有更全面的认识, 为临床救治提供新的诊疗思路。

参考文献

- [1] 陈瑜, 李艳, 余赞, 等. 细胞焦亡的分子机制及其在感染性疾病中的作用[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(2): 185-188.
- [2] 姜明霞, 祁玲, 李燕京. Caspase 家族在肿瘤细胞焦亡中的研究进展[J]. 肿瘤, 2020, 40(12): 70-78.
- [3] Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2006) Caspase-1-Dependent Pore Formation during Pyroptosis Leads to Osmotic Lysis of Infected Host Macrophages. *Cellular Microbiology*, **8**, 1812-1825. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x>
- [4] Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., et al. (2011) Non-Canonical Inflammasome Activation Targets Caspase-11. *Nature*, **479**, 117-121. <https://doi.org/10.1038/nature10558>
- [5] Aglietti, R.A., Estevez, A., Gupta, A., et al. (2016) GsdmD p30 Elicited by Caspase-11 during Pyroptosis Forms Pores in Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 7858-7863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607769113>
- [6] Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., et al. (2015) Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. *Immunity*, **43**, 923-932. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.009>
- [7] Zhang, J., Xia, L., Zhang, F., et al. (2017) A Novel Mechanism of Diabetic Vascular Endothelial Dysfunction: Hypodiponectinemia-Induced NLRP3 Inflammasome Activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1863**, 1556-1567. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.02.012>
- [8] van Hout, G.P., Bosch, L., Ellenbroek, G.H., et al. (2017) The Selective NLRP3-Inflammasome Inhibitor MCC950 Reduces Infarct Size and Preserves Cardiac Function in a Pig Model of Myocardial Infarction. *European Heart Journal*, **38**, 828-836. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw247>
- [9] Schmid-Burgk, J.L., Dhruv, C., Tobias, S., et al. (2016) A Genome-Wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Biological Chemistry*, **291**, 103-109. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.700492>

- [10] He, W., Wan, H., Hu, L., *et al.* (2015) Gasdermin D Is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1 β Secretion. *Cell Research*, **25**, 1285-1298. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>
- [11] Coll, R.C., Robertson, A.A.B., Chae, J.J., *et al.* (2015) A Small-Molecule Inhibitor of the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Nature Medicine*, **21**, 248-255. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>
- [12] 祁会丽. 细胞焦亡激活机制及相关疾病研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(5): 417-419.
- [13] Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B.A., *et al.* (2016) Pyroptosis Triggers Pore-Induced Intracellular Traps (PITs) That Capture Bacteria and Lead to Their Clearance by Efferocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, **213**, 2113-2128. <https://doi.org/10.1084/jem.20151613>
- [14] Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K.J., *et al.* (2016) Inhibiting the NLRP3 Inflammasome with MCC950 Promotes Non-Phlogistic Clearance of Amyloid- β and Cognitive Function in APP/PS1 Mice. *Brain Behavior & Immunity*, **61**, 306-336. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.014>
- [15] Song, L., Pei, L., Yao, S., *et al.* (2017) NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **11**, Article No. 63. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00063>