

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.045

# 胆固醇结晶激活动脉粥样硬化斑块巨噬细胞 NLRP3 炎症体的途径

孟玲丽 姚剑挺 田野<sup>△</sup> 旦菊花

(哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要:** 动脉粥样硬化既是胆固醇在血管壁聚集的疾病,也是发生在动脉壁的一种低强度慢性炎症形式。近年来有研究证实胆固醇结晶在动脉粥样硬化发生发展中具有重要作用。新的显微技术证实,胆固醇结晶在动脉粥样硬化斑块形成的早期即已出现,并与早期炎症有关。胆固醇结晶通过诱发局部炎症,促进大的脂质核心形成;刺破纤维帽,导致斑块破裂进而促进动脉粥样硬化斑块的进展。在影响斑块进程中,NLRP3 炎症体的激活对此发挥了重要的作用。NLRP3 炎症体是研究最多最明确的炎症体,其与非炎症性疾病的发生发展密切相关。以胆固醇结晶激活 NLRP3 炎症体的途径作为研究靶点,为动脉粥样硬化的诊断和治疗提供了新的思路和方法。该文就胆固醇结晶在动脉粥样硬化斑块中激活巨噬细胞 NLRP3 炎症体的两种途径做一综述。

**关键词:** 胆固醇结晶;动脉粥样硬化斑块;NLRP3 炎症体

**中图分类号:** R543.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)01-195-03

## The Ways of Cholesterol Crystals Activate the Atherosclerotic Plaque Macrophages NLRP3 Inflammasome

MENG Ling-li, YAO Jian-ting, TIAN Ye<sup>△</sup>, DAN Ju-hua

(Department of cardiology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

**ABSTRACT:** Atherosclerosis is a disease of aggregation of cholesterol in the vessel wall, and also a low-intensity chronic inflammation form that occurs in the artery wall. In recent years, some researches have shown that cholesterol crystals play an important role on atherosclerosis development. New microscopy technology confirmed that cholesterol crystals had emerged in the early atherosclerotic plaque formation, which related with early inflammatory. Cholesterol crystals induce local inflammation, and promote the formation of large lipid core; pierce the fibrous cap, leading to plaque rupture thereby promoting the atherosclerotic plaque development. During the process of impacting plaques, NLRP3 inflammasome activation plays a critical part for it. NLRP3 inflammasome is the up most explicit inflammasome, closely related to the development of non-inflammatory diseases. Cholesterol crystals activating the NLRP3 inflammasome pathway is considered as one possible research target, providing new ideas and methods for the diagnosis and treatment of atherosclerosis. This article is aimed to review two ways of cholesterol crystals activating the atherosclerotic plaque macrophages NLRP3 inflammasome.

**Key words:** Cholesterol crystals; Atherosclerotic plaque; NLRP3 inflammasome

**Chinese Library Classification(CLC):** R543.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2015)01-195-03

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)性心血管疾病是一种多因性、渐进性、炎症性疾病,主要累及大型及中型动脉<sup>[1]</sup>。其发病率及死亡率逐年增高,并严重危害人类健康<sup>[2]</sup>。2010 年到 2030 年,中国心血管疾病患者总数将增加 2130 万,死亡人数将增加 770 万<sup>[3]</sup>。动脉粥样硬化的发病机理的研究已有一百多年历史,并且有多种假说从不同角度进行阐述,如脂质浸润、同型半胱氨酸、氧化应激、损伤反应、内皮损伤等,但都不足以确切解释其发病机制<sup>[4]</sup>。动脉粥样硬化斑块的炎症反应学说成为目前研究热点<sup>[5,6]</sup>,但是炎症与斑块进展之间孰因孰果仍然没有定论。应用高倍镜观察动脉粥样硬化斑块,可见有许多吞噬大量脂质的巨噬细胞和胆固醇结晶,近年来有研究证实微小胆固醇结晶不仅具有理化特性,更为重要的是,可以作为一种内源性物质

引起生物学反应,在动脉粥样硬化发生发展中起重要作用。本文将对此做一综述。

### 1 胆固醇结晶出现在动脉粥样硬化斑块早期

炎症反应在动脉粥样硬化中的作用已经得到公认,目前启动动脉壁炎症的物质仍未明确。动物实验研究表明无菌性动物易患动脉粥样硬化,提示内源性物质可诱发动脉壁的炎症反应<sup>[7]</sup>。在 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠的动脉粥样硬化斑块的组织病理学切片中,我们经常可以看到大量的针状胆固醇结晶在脂质坏死核心聚集。人们虽然对斑块中胆固醇结晶的来源还不甚清楚<sup>[8]</sup>,但是通常认为结晶仅仅是斑块炎症反应后期的产物,并没有其他重要的作用。2010 年,Abela, G. S 等发现斑块内部的胆固醇在温度、pH 值发生变化时迅速发生结晶,体积增大,导致内膜和纤维帽破裂<sup>[9]</sup>。胆固醇结晶的沉着物在成熟的动脉粥样硬化病变的坏死核心中肉眼可见,然而,他们在动脉粥样硬化晚期的出现已不被认为是主要的炎症刺激物。

Duwell, P.<sup>[10]</sup>等人运用新型的显微观察技术发现,在斑块

作者简介:孟玲丽(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:动脉粥样硬化,电话:13624501590, E-mail: menglinglismart@126.com

△通讯作者:田野,电话:13804591966, E-mail: yetian6@163.com

(收稿日期:2014-05-08 接受日期:2014-05-31)

病变早期,微小的胆固醇结晶就已经大量存在,并且伴随着炎症细胞的浸润。胆固醇结晶及其他结晶物质能够通过刺激 caspase-1 依赖的 NLRP3 炎症体活化来诱导炎症<sup>[11,12]</sup>,导致 IL-1 家族细胞因子分泌。将胆固醇结晶注入小鼠腹膜内,可引起急性炎症,然而在缺乏 NLRP3 炎症体、组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 L 或 IL-1 分子等小鼠体内,这种炎症反应受到损坏。将 LDL 受体缺失的小鼠进行 NLRP3、ASC、IL-1 $\alpha/\beta$  基因敲除小鼠的骨髓移植,并给予高胆固醇喂养,小鼠的早期的动脉粥样硬化程度显著减轻,炎症依赖的 IL-18 的水平明显降低。在巨噬细胞中,轻度修饰的 LDL 能导致胆固醇结晶协同 NLRP3 炎症体启动和激活<sup>[10]</sup>。有研究证实,沉积在动脉壁或体内其他地方的胆固醇结晶充当了内源性的危险信号,是引起早期动脉粥样硬化的主要因素,而不是炎症的晚期后果。

## 2 NLRP3 炎症体促进动脉粥样硬化斑块进展

### 2.1 NLRP3 炎症体的结构和功能

炎症体是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase-1) 蛋白活化的分子平台,对 IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-33 等促炎细胞因子的成熟和分泌进行调控,启动机体的先天性免疫防御功能。深入的研究表明 NLRP3 炎症体是目前研究最多也最明确的一个炎症体,NLRP3 炎症体由 NLRP3 支架、凋亡相关点样蛋白(ASC)和 caspase-1 三部分组成<sup>[13]</sup>,分子量约为 700 kDa,是一类大分子蛋白复合体。NLRP3 炎症体对 caspase-1 的激活具有非常重要的调节作用,其在细胞质内发挥外源性微生物或内源性危险信号感受器的作用,在固有免疫、获得性免疫反应中发挥重要作用。NLRP3 可被多种类型的病原体或危险信号所激活,参与了非感染性炎症疾病如痛风<sup>[14]</sup>、2 型糖尿病<sup>[15]</sup>、阿尔兹海默病<sup>[16]</sup>的发生发展。近年来,NLRP3 炎症体在动脉粥样硬化中的作用及其意义日益受到关注。

### 2.2 NLRP3 炎症体激活促进动脉粥样硬化斑块进展

IL-1 $\beta$  作为炎症中重要的多功能细胞因子,在动脉粥样硬化的发生和发展中发挥着非常重要的作用<sup>[17]</sup>。NLRP3 基因敲除后能明显降低 IL-1 $\beta$  的表达和释放,表明 NLRP3 炎症体对 IL-1 $\beta$  的产生有着重要的作用并可能成为动脉粥样硬化的治疗靶点<sup>[18]</sup>。

近来研究表明在动脉粥样硬化退行性变过程中,氧化应激能够诱导炎症体的募集,其中 NLRP3 炎症体是细胞应激信号诸如神经酰胺类及组织蛋白酶 B 等的主要免疫感受器,并进一步加快动脉粥样硬化的进展<sup>[19]</sup>。Shi 等<sup>[20]</sup>证明自噬调节 NLRP3 炎症体的清除,从而控制巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  以及发生炎症的可能性。NLRP3 炎症体的 ASC 成分经 Lys63 位点多次泛素化,并与 P62 接头蛋白结合,使 NLRP3 复合体趋于自噬裂解。随着年龄的增长,自噬能力的降低可能会导致 NLRP3 炎症体出现的几率增加,从而促进斑块的产生与进展。

## 3 胆固醇结晶通过溶酶体破裂途径激活 NLRP3 炎症体

在 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化斑块早期,胆固醇结晶出现伴随炎症细胞的浸润,同时巨噬细胞吞噬胆固醇结晶,导致吞噬溶酶体的破裂,释放组织蛋白酶 B,激活 NLRP3 炎症体,剪切 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18,产生有活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18<sup>[21]</sup>。IL-1 $\beta$  和 IL-18 是很强的促炎因子,能刺激内皮细胞表达内皮粘附分子,吸引更多的炎症细胞浸润至内皮下,加剧斑块局部的炎症

环境,导致斑块的进展<sup>[22]</sup>。研究者发现,使用组织蛋白酶 B 特异性抑制剂 CA074Me 或者基因敲除组织蛋白酶 B 之后,胆固醇结晶刺激 NLRP3 炎症体产生 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的作用明显减弱,证实了组织蛋白酶 B 在 NLRP3 炎症体激活中的重要作用。

Riteau, N 等人<sup>[23]</sup>同时证实巨噬细胞在吞噬晶体状物质(如尿酸结晶、二氧化硅、铝)后,诱发吞噬溶酶体的破裂,释放组织蛋白酶 B<sup>[24]</sup>,同时可以引发细胞内 ATP 通过 pannexin/connexin 半通道进入胞外,胞外 ATP 通过 P2X7 受体引发胞内 ATP 的进一步释放<sup>[24]</sup>。最后,胞外的 ATP 及其它的水解产物 ADP 通过刺激嘌呤能 P2X7 受体,引起胞内的钾离子外流进而激活 NLRP3 炎症体,产生有活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18。

研究者们虽然证实了溶酶体破裂释放的组织蛋白酶 B 在激活 NLRP3 炎症体中的重要作用,但是,组织蛋白酶 B 或其水解产物、抑或其启动的下游信号通路,三者各自在 NLRP3 炎症体激活中的作用还需进一步研究和阐明。

## 4 胆固醇结晶通过线粒体活性氧途径激活 NLRP3 炎症体

Zhou, R 等<sup>[25]</sup>研究证实巨噬细胞可以吞噬胆固醇结晶等颗粒状物质,导致细胞内大量活性氧(ROS)的产生,ROS 可以与细胞内的硫氧还原蛋白(TRX)发生作用,导致 TRX 和硫氧还原结合蛋白(TXNIP)分离,从而使 TXNIP 结合到 NLRP3,随后 TXNIP 激活 NLRP3 炎症体。Meissner, F 等<sup>[26]</sup>在超氧化物歧化物 1(SOD1)敲除的巨噬细胞和 SOD1 敲除鼠中发现,细胞内大量的超氧化物会使 caspase-1 发生谷胱甘肽化反应,影响细胞的活性,进而抑制 caspase-1 的活化,导致 IL-1 $\beta$ 、IL-18 产生减少。从这些研究的相悖结果中可以推测,ROS 与 NLRP3 炎症体的量效关系中可能存在一个拐点,进一步证实此拐点的存在及其位置可能更深层的揭示 ROS 在 NLRP3 炎症体激活中所起的作用。

在真核细胞中,黄嘌呤氧化酶<sup>[27]</sup>、NADPH 氧化酶<sup>[28]</sup>、线粒体都可以产生 ROS。那么,不同的酶类或是亚细胞器产生的 ROS 在 NLRP3 炎症体激活中的作用是否一致呢?Dostert, C 等<sup>[29]</sup>提出巨噬细胞在吞噬石棉和二氧化硅时,通过 NADPH 氧化酶产生的 ROS 可以激活 NLRP3 炎症体。Van Bruggen, R 等<sup>[30]</sup>从慢性肉芽肿疾病的病人中提取单核细胞,此种单核细胞缺乏 NADPH 氧化酶(NOX1-4)的亚基 p22phox。他们发现,这种单核细胞与二氧化硅、尿酸结晶共孵育时,IL-1 $\beta$ 、IL-18 产生的量并未有所减少,说明在这种单核细胞中 NLRP3 炎症体的激活并不依赖 NADPH 氧化酶。这两种截然相反的结果很可能跟所选用的细胞系不同,实验条件不同有密切关系。

线粒体不仅是细胞内的能量来源和最重要的产生 ROS 的细胞器,而且发挥着调节免疫、控制代谢等作用<sup>[31]</sup>。Zhou, R<sup>[32]</sup>等人用实验证实呼吸链复合体 I 和 III 抑制剂鱼藤酮、抗霉素 A 抑制巨噬细胞线粒体的呼吸功能后,线粒体产生的 ROS 增多,此时,原先分布在内质网上的 NLRP3 蛋白被特异性激活,分布至线粒体周围并招募 ASC 和 pro-caspase-1 蛋白,最后激活 NLRP3 炎症体<sup>[33]</sup>,使细胞分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-18。这说明,线粒体在炎症体激活的过程中起到了一定的调控作用<sup>[34]</sup>。

## 5 总结与展望

胆固醇结晶激活动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞内 NLRP3 炎症体的机理虽然还未阐释清楚,但其作用的信号通路已初见端倪。关于胆固醇结晶促进动脉粥样硬化斑块的进展,目前主要提出两条可能的激活途径:第一、胆固醇结晶通过诱导细胞内溶酶体破裂,释放组织蛋白酶 B 导致 NLRP3 炎症体激活;第二、胆固醇结晶通过诱导细胞内适量线粒体 ROS 的产生激活 NLRP3 炎症体。深入研究胆固醇结晶的物理化学和生物学作用,为动脉粥样硬化斑块炎症机理的研究揭开了新篇章,并为临床诊断与治疗动脉粥样硬化提供一个新思路与方向。因此,对胆固醇结晶与动脉粥样硬化中炎症发生的关系的研究具有重要的理论研究价值及广泛的应用前景。

#### 参考文献(References)

- [1] Kevin J. Woollard, Frederic Geissmann. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(2): 77-86
- [2] R Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362: 801-809
- [3] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in china: markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-china[J]. *Circulation*, 2010, 3(3): 243-252
- [4] JJ Li, CH Fang. Atheroscleritis is a more rational term for the pathological entity currently know as atherosclerosis [J]. *Med Hypotheses*, 2004, 63(1): 100-102
- [5] EL Gautier, T Huby, JL Witztum, et al. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage[J]. *Circulation*, 2009, 119: 1795-1804
- [6] P Libby. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Nature*, 2002, 420: 868-874
- [7] Samuel D. Wright, Charlotte Burton, Melba Hernandez, et al. Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis[J]. *Exp. Med*, 2000, 191: 1437-1442
- [8] G Kellner-Weibel, PG Yancey, WG Jerome, et al. Crystallization of Free Cholesterol in Model Macrophage Foam Cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 1891-1898
- [9] Abela, G. S. Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation [J]. *J Clin Lipidol*, 2010, 4(3): 156-164
- [10] 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
- [11] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440: 237-241
- [12] Hornung. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization [J]. *Nature Immunol*, 2008, 9: 847-856
- [13] Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, et al. The inflammasome: a danger Sensing Complex triggering innate immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 615-622
- [14] Martinon F. Mechanisms of uric acid crystal-mediated auto-inflammation[J]. *Immunol Rev*, 2010, 233: 218-232
- [15] Boni-Schnetzler M, Thorne J, Parnaud G, et al. Increased interleukin (IL)-1 beta messenger ribonucleic acid expression in beta-cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1 beta in human islets by glucose and auto-stimulation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93: 4065-4074
- [16] Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9: 857-865
- [17] DJ Rader. IL-1 and atherosclerosis: a murine twist to an evolving human story[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 27-30
- [18] Nixon Tangi T, Elmabsout AA, Bengtsson T, et al. Role of NLRP3 and CARD8 in the regulation of TNF- $\alpha$  induced IL-1 $\beta$  release in vascular smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(3): 697-702
- [19] Ungvari Z, Kaley G, De Capo R, et al. Mechanisms of vascular aging: new perspectives [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65A: 1028-1041
- [20] Shi CS, Shenderov K, Huang NN, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13: 255-263
- [21] Manoranjan Sahoo, Ivonne Ceballos-Olvera, Laura del Barrio, et al. Role of the Inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in Bacterial Infections [J]. *The Scientific World*, 2011, 11: 2037-2050
- [22] Vonder Thusen JH. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential [J]. *Pharmacological Reviews*, 2003, 55: 133-166
- [23] Riteau N, Baron L, Villeret B, et al. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation[J]. *Cell death & disease*, 2012, 3: e403
- [24] Kahlenberg J M, Dubyak G R. Mechanisms of caspase -1 activation by P2x7 receptor - mediated K release [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286(5): C1100-C1108
- [25] Zhou R, Tardivel A, Thorens, B, et al. Thioredoxin interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 136-140
- [26] Meissner F, Molawi K, Zychlinsky, A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9: 866-872
- [27] Sparacino-Watkins CE, Lai YC, Gladwin MT. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in pulmonary arterial hypertension therapeutics [J]. *Circulation*, 2012, 125: 2824-2826
- [28] Bedard K, Krause K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87: 245-313
- [29] Catherine Dostert, Virginie Petrilli, Robin Van Bruggen, et al. Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica[J]. *Science*, 2008, 320: 674-677
- [30] R van Bruggen, MY Koker, M Jansen, et al. Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent [J]. *Blood*, 2010, 115: 5398-5400
- [31] David J Hall, Sung-Ho Han. Dynamic optical imaging of metabolic and NADPH oxidase-derived superoxide in live mouse brain using fluorescence lifetime unmixing[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2012, 32: 23-32
- [32] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2010, 469: 221-225
- [33] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(3): 210-215
- [34] A. Phillip West, Gerald S. Shadel, Sankar Ghosh. Mitochondria in innate immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(6): 389-402