

NLRP3/IL-1 β 途径的促动脉粥样硬化作用及临床应用

武亚琳¹ 梁斌² 杨志明²

(1. 山西医科大学, 山西 太原 030000; 2. 山西医科大学第二临床医学院心内科, 山西 太原 030000)

【摘要】心血管疾病是全球首要死亡原因, 动脉粥样硬化是其潜在病理机制。目前, 动脉粥样硬化的炎症理论已深入人心。Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study (CANTOS) 直接验证这一理论, 它证明了白介素 (IL)-1 β 的特异性抗体 canakinumab 的临床治疗前景。IL-1 β 是 IL-1 家族中经典的促炎细胞因子, 可促进动脉粥样硬化形成及斑块不稳定。炎症小体参与炎症的发生与进展, NLRP3 炎症小体是研究最为广泛的炎症小体, 激活的 NLRP3 炎症小体可促进 IL-1 β 的分泌与成熟, 导致动脉粥样硬化进展。现主要综述 NLRP3/IL-1 β 途径在动脉粥样硬化中的作用, 并结合 CANTOS 结果探讨抗炎治疗在临床上的应用前景。

【关键词】动脉粥样硬化; 炎症; NLRP3 炎症小体; 白介素-1 β ; CANTOS

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.06.026

The Role of NLRP3/IL-1 β in Atherosclerosis and Its Clinical Application

WU Yalin¹, LIANG Bin², YANG Zhiming²

(1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, Shanxi, China; 2. Department of Cardiology, The Second Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, Shanxi, China)

【Abstract】 Cardiovascular disease is currently the leading cause of death worldwide, and atherosclerosis (AS) is the potential pathologic mechanism. At present, the theory of inflammation of atherosclerosis has been deeply confirmed. The Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study (CANTOS) results directly validate this theory, which demonstrates the clinical therapeutic potential of IL-1 β specific antibody canakinumab. IL-1 β is a classical pro-inflammatory cytokine in the IL-1 family that promotes AS and plaque instability. Inflammasomes are involved in the development and progression of inflammation. NLRP3 inflammasome was the most widely studied. Activated NLRP3 inflammasome promote the secretion and maturation of IL-1 β , leading to the progression of AS. This article mainly describes the role of NLRP3/IL-1 β pathway in AS, and combined with the results of CANTOS to explore the clinical application of anti-inflammatory therapy.

【Key words】 Atherosclerosis; Inflammation; NLRP3 inflammasome; IL-1 β ; CANTOS

心血管疾病是全球首要死亡原因, 严重威胁人类健康, 给社会带来极大负担。心血管事件如心肌梗死、脑梗死是导致心血管疾病死亡的主要病因, 其主要是由动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 血栓闭塞引起。一直以来, 脂质异常被认为是 AS 的重要发病机制, 调脂治疗在 AS 疾病中占核心地位。但临床研究发现, 即使经标准二级预防, 血脂水平达标, 患者仍存在较大的复发及死亡风险。

1999 年 Ross^[1] 提出 AS 是一种慢性炎症性疾

病, 此后越来越多的研究结果证明炎症反应在 AS 过程中起重要作用。炎症小体 (inflammasome, 亦被称为炎性小体/炎性体) 是新近发现的一类大分子蛋白复合体, 已被多项研究证明其可以参与调节多种炎症性疾病, 包括 AS^[2]。其中, NLRP3 炎症小体 (NOD [nucleotide oligomerization domain]-, LRR [leucine-rich repeat]-, and PYD [pyrin domain]-containing protein 3, 又称 NALP3) 是目前研究最多、最具代表性的。活化的 NLRP3 炎症小体可激活 caspase-1, 进而促使白介

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81570273)

通讯作者: 杨志明, E-mail: Zhimingyang800@sina.com

素 (IL)-1 β 、IL-18 分泌与成熟, 导致 AS 斑块进展。Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study (CANTOS) 证实了 IL-1 β 在 AS 中的炎症理论。鉴于 CANTOS 的积极结果, 现主要介绍 NLRP3 炎症小体 /IL-1 β 在 AS 中的经典促炎途径, 并探讨抗炎治疗的临床二级预防前景。

1 NLRP3/IL-1 β 通路的活化机制

1.1 NLRP3/IL-1 β 通路的组成

1.1.1 NLRP3 炎症小体

2002 年炎症小体被首次提出, 现炎症在先天性免疫中的作用已被深入研究。不同组织器官的先天性免疫细胞通过模式识别受体识别病原体相关分子模式和损伤相关分子模式, 促进免疫应答、分泌相关炎症细胞因子^[3]。模式识别受体被激活后可形成多蛋白复合体 - 炎症小体, 主要由胞浆型模式识别受体、衔接蛋白 ASC (一种凋亡相关的斑点样蛋白) 和效应蛋白 pro-caspase-1 组成^[4]。模式识别受体是炎症小体的核心, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (NLRs) 家族蛋白是其中最重要的一种。NLRP3 炎症小体是 NLRs 家族中的一员, 因其在炎症和免疫反应中的重要作用而备受关注。

NLRP3 炎症小体由受体蛋白 NLRP3、衔接蛋白 ASC 和效应蛋白 pro-caspase-1 构成^[4]。正常情况下, caspase-1 的主要存在形式是 pro-caspase-1, 它不具有生物学活性。NLRP3 被激活后, ASC 可将 pro-caspase-1 召集起来, 形成炎症小体。炎症小体自我切割产生具有活性的 caspase-1, 其进一步切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 生成活性的 IL-1 β 和 IL-18, 从而促进炎症反应^[5]。

1.1.2 IL-1 β

在炎症反应中, 炎症介质不一定会主动触发 AS, 但其可将危险因素进行信号转导, 从而导致 AS 发生^[6]。参与免疫调节的细胞因子是炎症的中枢介质。大多数先天性和获得性免疫细胞均表达 IL-1 家族细胞因子, 包括促炎细胞因子 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33、IL-36 α 、IL-36 β 和 IL-36 γ) 和抗炎细胞因子 (IL-37)^[7]。其中, 研究最多的是 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18 和 IL-1Ra, 而 IL-1 β 因其在炎症性疾病中的重要作用备受关注。

IL-1 β 通常以前体形式 (pro-IL-1 β) 存在于细胞内。pro-IL-1 β 是诱导型表达, 需通过核因子 κ B 介导的转录信号诱导表达。因此, IL-1 β 转录由激活 Toll 样受体的促炎刺激介导, 但也可通过 IL-1 β 的自分泌信号介导, 提供正反馈通路。

IL-1 β 上有两个结合域, 分别与不同的受体结合。

一种与 IL-1 I 型受体结合发挥促炎作用, 一种与 IL-1 受体辅助蛋白结合发挥负性调节作用。另外, IL-1 受体拮抗剂竞争性地抑制 IL-1 与受体结合; IL-1 II 型受体结合配体但不发出信号, 从而多方面严格调控 IL-1 β 的作用。

1.2 NLRP3/IL-1 β 通路的激活

NLRP3 炎症小体可被多种病原体相关分子模式和损伤相关分子模式激活, 通常需两个步骤, 即引发和激活。首先, 信号通过刺激细胞表面的 Toll 样受体, 激活细胞内核因子 κ B, 导致受体蛋白 NLRP3、多种炎症因子前体 (如 pro-IL-1 β) 表达量增加^[8]。之后, 信号激活 NLRP3, 磷酸化 ASC 招募 pro-caspase-1, 组装成炎症小体, 通过自我激活产生 caspase-1, 从而促进多种 IL-1 β 、IL-18 等促炎介质的合成与分泌^[5]。

NLRP3 炎症小体经典激活模式有三种: (1) 离子通道模式: 细胞损伤或坏死时, 释放出的 ATP 可激活细胞表面 ATP 门控的 P2X7 离子通道, 促发细胞内钾离子外流, 同时招募半通道蛋白 pannexin-1 在细胞膜上形成孔隙, 使 NLRP3 激活物进入细胞内激活 NLRP3 炎症小体^[9]。(2) 溶酶体模式: 细胞吞噬晶体 (如胆固醇晶体、尿酸晶体) 导致溶酶体损伤释放组织蛋白酶, 激活 NLRP3 炎症小体^[10]。(3) 活性氧模式: 硫氧还原蛋白相互作用蛋白是 NLRP3 炎症小体活化的必需物质, 被还原型辅酶 II (或称还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸) 活化的活性氧可以诱导硫氧还原蛋白相互作用蛋白与 NLRP3 的结合, 进一步激活 NLRP3 炎症小体^[11]。此外, 钾离子外流、溶酶体破裂和组织蛋白酶的释放均可使活性氧表达升高, 从而激活 NLRP3 炎症小体^[12]。

IL-1 家族细胞因子多为前体分子, 需通过酶促切割成为具有生物活性的细胞因子, IL-1 β 亦是如此。pro-IL-1 β 不具有生物活性, 需通过活化的 NLRP3 炎症小体激活的 caspase-1 进行蛋白水解加工, 将 33 kDa 的前体切割成 17 kDa 的活性形式, 从而在胞外发挥生物学作用。此外, 局部炎症可独立于 caspase-1 直接促使 IL-1 β 活化, 而 IL-1 β 的局部激活是调节 IL-1 β 促炎反应的重要因素, 亦可导致继发性炎症介质 (包括 IL-6) 的活化; 反之, IL-6 通过系统作用引起急性期反应, 使肝细胞生成急性期蛋白, 如 C 反应蛋白、纤维蛋白原和纤溶酶原激活物抑制剂等, 它们与 AS 斑块的形成及稳定密切相关。

2 NLRP3/IL-1 β 通路的促 AS 作用机制

2.1 IL-1 β 的促 AS 作用机制

大量数据表明 IL-1 β 在 AS 中有重要作用。与人正

常冠状动脉相比, AS 患者中 IL-1 β 水平升高, 并与疾病严重程度呈正相关^[13]。ApoE^{-/-} 小鼠可因缺乏 IL-1 β 而延缓 AS 病变的进展^[14]。同样的, 在饮食诱导 AS 的 ApoE^{-/-} 小鼠中, 给予 IL-1 β 单克隆抗体治疗, 可明显减缓斑块的进展^[15]。

目前, IL-1 β 在 AS 进展中的作用已被证实, 主要通过导致血脂代谢紊乱、促进内皮细胞表达黏附分子、巨噬细胞吞噬脂质转化为泡沫细胞、平滑肌细胞增殖、促进促炎分子 IL-1、IL-6 表达等多方面起作用。

2.2 NLRP3 炎症小体的促 AS 作用

IL-1 β 在 AS 中的促炎作用已得到证实, 因此, IL-1 β 的上游激活物 NLRP3 炎症小体被广泛关注, 并被证实在 AS 中起关键作用。

2010 年, Duewell 等^[2] 第一次证明 NLRP3 炎症小体对促 AS 有重要作用, 其将几种基因缺陷型骨髓 (NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-} 及 NLRP3^{-/-}/ASC^{-/-}) 分别植入 LDLR^{-/-} 受体小鼠体内, 研究结果表明特异性基因缺陷的小鼠的 AS 斑块面积明显缩小。有报道冠状动脉粥样硬化患者主动脉的 NLRP3 升高, 其与疾病的严重程度及 AS 的危险因素 (包括血脂异常、高血压、糖尿病、肥胖、吸烟等) 呈正相关, 与高密度脂蛋白呈负相关^[16-17]。此外, 有两项独立研究表明, 与非 AS 肠系膜或髂动脉相比, 颈动脉粥样硬化斑块组织中 NLRP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 的表达显著增加^[18-19]。与对照组相比, 有症状者 NLRP3 表达水平明显升高^[18]。另外, 与稳定的 AS 斑块相比, 不稳定性斑块所含 NLRP3 炎症小体信号组分表达显著增高^[19]。上述结果均表明 NLRP3 炎症小体的促 AS 作用。

3 CANTOS 试验——针对 AS 的 IL-1 β 途径

上述研究结果均证实了炎症途径在 AS 中的关键作用, 但无临床试验直接验证 AS 的炎症通路。因此, CANTOS 应运而生, 直接测试特异性靶向抑制 IL-1 β 对临床心血管事件的影响。

CANTOS 是一项随机、双盲、对照的多中心研究, 它在全球 39 个国家募集 10 061 例既往心肌梗死、目前处于炎症状态 [血浆高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) >2 mg/L] 的心脏病患者, 将患者随机、双盲分配入安慰剂组、50 mg、150 mg、300 mg canakinumab (针对 IL-1 β 的治疗性单克隆抗体) 组, 主要观察血液中 hs-CRP、血脂 (包括低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、甘油三酯) 水平变化, 比较各组临床终点事件 (非致死性心肌梗死、非致死性卒中或心血管死亡) 的发生率。结果表明: (1) 与安慰剂组相比, 在 50 mg、150 mg、300 mg 剂量组中, hs-CRP 分别从基线水平降低了 26%、37%、41% ;

在 IL-6 中观察到相似的结果 ; (2) 脂质水平无显著改变 ; (3) 安慰剂组、50 mg、150 mg、300 mg 组的主要终点事件年发生率分别为 4.50%、4.11%、3.86%、3.90%。经统计学分析后得出 : 与安慰剂组相比, 各组 hs-CRP 降低均有统计学差异 ; 与安慰剂组相比, 150 mg 剂量组主要终点事件的发生率具有显著性差异。由此可得出结论 : 与安慰剂组相比, 150 mg 剂量 每 3 个月 1 次), 针对 IL-1 β 固有免疫途径的抗炎治疗可使心血管事件复发率明显降低, 与脂质水平无关^[20-21]。CANTOS 结果直接证明了 AS 中的炎症理论, 为 AS 的临床抗炎治疗提供了理论依据。

4 总结与展望

目前, NLRP3/IL-1 β 的促 AS 作用已得到广泛认可, CANTOS 直接证实了这一理论, 将抗炎治疗积极应用于临床二级预防极其必要。

Canakinumab 是被国际监管机构批准为针对多种遗传性 IL-1 过表达综合征的孤儿药。虽然 CANTOS 证明可将抑制 IL-1 β /IL-6/C 反应蛋白先天免疫途径作为 AS 的保护靶点, 但因其价格昂贵, 广泛应用于临床受限。因此, 研究者正积极寻求其他抗炎药物。另一项研究 CIRT (心血管炎症减少试验) 提供了新的方向, 它募集 4 786 例类似患者, 评估甲氨蝶呤 (一种廉价且已得到临床应用的抗炎药) 对心血管炎症的影响。结果表明 : 与安慰剂组相比, 低剂量甲氨蝶呤既不减少 IL-1 β 、IL-6 或 hs-CRP, 也不降低心血管事件发生率^[22]。上述结果可能与介导低剂量甲氨蝶呤的腺苷信号转导机制包含完全不同的炎症抑制途径相关, 其与 AS 血栓形成的相关性较低^[23]。

CANTOS 和 CIRT 结果对比可以得出 : 对于 AS 的抗炎治疗, 研究者应具有靶向性而非广泛性, 应高效特异性抑制 IL-1 β 的上游或下游^[24] 细胞因子。因此, 未来的研究方向必须集中在靶向 IL-6 抑制剂以及 NLRP3 炎症小体的上游抑制^[25], 目前已有一些实验正在进行中。已有动物模型报道使用 NLRP3 抑制剂 MCC950 可减少 AS 病变和梗死面积, 同时适度改善左心室功能^[26-27]。虽然达到预期效果, 但其安全性不够清楚, 研究者需进一步深入研究, 评价其可靠性、安全性及与人类相似性, 积极促进抗炎治疗二级预防的应用。

参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2):115-126.
- [2] 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.
- [3] Rock KL, Latz E, Ontiveros F, et al. The sterile inflammatory response[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 321-342.
 - [4] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta[J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 417-426.
 - [5] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression[J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 787-791.
 - [6] Libby P. History of discovery: inflammation in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): 2045-2051.
 - [7] Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity[J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1): 8-27.
 - [8] Abais JM, Xia M, Zhang Y, et al. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector?[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(13): 1111-1129.
 - [9] Dubyak GR. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells[J]. *Cell Microbiol*, 2012, 14(11): 1697-1706.
 - [10] Orlowski GM, Colbert JD, Sharma S, et al. Multiple cathepsins promote pro-IL-1 β synthesis and NLRP3-mediated IL-1 β activation[J]. *J Immunol*, 2015, 195(4): 1685-1697.
 - [11] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136-140.
 - [12] Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, et al. NLRP3 inflammasome: its regulation and involvement in atherosclerosis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2116-2132.
 - [13] Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, et al. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(8): 1000-1006.
 - [14] Kirii H, Niwa T, Yamada Y, et al. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(4): 656-660.
 - [15] Bhaskar V, Yin J, Mirza AM, et al. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 216(2): 313-320.
 - [16] Zheng F, Xing S, Gong Z, et al. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis[J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(9): 746-750.
 - [17] Bando S, Fukuda D, Soeki T, et al. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242(2): 407-414.
 - [18] Paramel Varghese G, Folkersen L, Strawbridge RJ, et al. NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(5): e003031.
 - [19] Shi X, Xie WL, Kong WW, et al. Expression of the NLRP3 inflammasome in carotid atherosclerosis[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24(11): 2455-2466.
 - [20] Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Anti-inflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(12): 1119-1131.
 - [21] Libby P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond[J]. *JACC*, 2017, 70(18): 2278-2289.
 - [22] Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, et al. Low-dose methotrexate for the prevention of atherosclerotic events[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(8): 752-762.
 - [23] Chan ES, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6(3): 175-178.
 - [24] Ridker PM. From C-reactive protein to interleukin-6 to interleukin-1: moving upstream to identify novel targets for atheroprotection[J]. *Circ Res*, 2016, 118(1): 145-156.
 - [25] Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(4): 203-214.
 - [26] van der Heijden T, Kritikou E, Venema W, et al. NLRP3 inflammasome inhibition by MCC950 reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice—brief report[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(8): 1457-1461.
 - [27] van Hout GP, Bosch L, Ellenbroek GH, et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 828-836.

收稿日期: 2019-02-21