

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.18.029

网络首发 <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20190619.1332.051.html>(2019-06-20)

细胞焦亡与肝脏缺血再灌注损伤

王小莹¹综述,申丽娟^{1△},刘作金^{2▲}审校

(1. 昆明医科大学基础医学院病理学教研室,昆明 650000;

2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

[摘要] 细胞焦亡是近年来研究发现的形态学上与凋亡相似,伴随炎症反应发生的细胞程序性死亡。肝脏缺血再灌注损伤是肝叶切除手术、肝移植术和低血容量性休克的并发症,导致局部和远端细胞损伤和器官功能障碍。这种损伤既有急性无菌性炎症反应,又有再灌注时因内毒素血症引起的炎症反应参与其中,其特征为炎介质诱导炎症级联反应,最终损害肝脏实质细胞,甚至导致细胞死亡。近年来,研究发现细胞焦亡是肝脏缺血再灌注损伤的重要组成部分,炎症因子在此环节中起关键作用。本文结合文献就细胞焦亡与肝脏缺血再灌注损伤间的关系进行综述。

[关键词] 细胞焦亡;再灌注损伤;白细胞介素 1 β ;白细胞介素 18;Caspase-1;Caspase-11;NLRP3

[中图法分类号] R365 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)18-3184-04

Pyroptosis and hepatic ischemia-reperfusion injury

WANG Xiaoying¹, SHEN Lijuan^{1△}, LIU Zuojin^{2▲}

(1. Department of Pathology, College of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650000, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Pyroptosis is a kind of programmed cell death, which is similar to apoptosis in morphology and is associated with inflammatory reaction. Hepatic ischemia-reperfusion injury is a complication of hepatic lobectomy, liver transplantation, and hypovolemic shock, leading to local and distal cell damage and organ dysfunction. This injury involves both the acute aseptic inflammatory response and the inflammatory response caused by endotoxemia during reperfusion, which is characterized by the inflammatory mediators inducing the inflammatory cascade reaction, eventually damaging liver parenchymal cells and even leading to cell death. In recent years, studies have found that pyroptosis is an important component of hepatic ischemia-reperfusion injury, and inflammatory factors play a key role in this process. In this paper, the relationship between pyroptosis and hepatic ischemia-reperfusion injury was reviewed.

[Key words] pyroptosis; reperfusion injury; interleukin-1 β ; interleukin-18; Caspase-1; Caspase-11; NLRP3

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是临床上常发生于肝叶切除术、肝移植术中因肝门阻断及其他各种因素引起的低血容量休克后的一种常见的病理生理过程,缺血再灌注不仅不能使肝功能得以恢复,反而会导致肝脏组织结构受损、肝功能损伤。长期以来人们对 IRI 的机制进行研究,希望通过对机制的了解对 IRI 的过程进行干预,以提高肝脏对缺血缺氧过程的耐受性,从而减轻肝组织的损伤^[1-2]。近年来发现的细胞焦亡及其相关途径被证实存在于 IRI 的过程中,并通过对细胞焦亡途径的干

预,可减轻 IRI 的程度。

1 细胞焦亡

1.1 细胞焦亡 是近年来研究发现的形态学上与凋亡相似,伴随炎症反应发生的细胞程序性死亡。大量炎症因子伴随 Caspase-1 的活化而释放为其特征性反应。此过程趋化周围巨噬细胞,并诱导了细胞死亡。研究发现,由 Caspase-1 激活诱导的细胞焦亡是由一系列能形成炎症因子的模式识别受体所触发。细胞受到内源性或外源性损伤时会释放与人体自身免疫细胞通过一定数目的细菌编码的模式识别受体(pat-

tern recognition receptors, PRRs) 与识别自身的危险信号的损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 相结合。根据亚细胞定位, PRRs 可分为两类: 位于质膜上的跨膜蛋白 Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 和 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors, CLRs); 位于细胞内的蛋白, 包括: RIG 样受体 (RIG-like receptor, RIR), AIM2 样受体 (AIM2-like receptor, ALR), 核苷酸结合区和富含亮氨酸的重复序列 (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing, NLR) 蛋白。NLRs 和 ALRs 的亚群通过识别同源配体与凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 结合, 触发一种防御机制, 其中炎症因子在胞质中趋化聚集以激活促炎性 Caspase-1, 而 Caspase-1 的活化, 一方面对白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 进行激活, Caspase-1 通过切割 IL-1 β 和 IL-18 前体的方式, 促进其成熟与释放; 另一方面因其在急性慢性炎症反应过程中使机体对感染和损伤产生全身或局部的反应, 会导致细胞焦亡的发生^[3-4]。

1.2 细胞焦亡的途径 在哺乳动物中, NLRs 与 ALRs 对应的炎症因子主要包括 Nlrp1、Nlrp3、Nlcr4 和 AIM2, 当细胞受到外源性或内源性损伤时会释放大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 物质, 与特定模式识别受体结合并将其激活是活化这类炎症因子的关键。细胞焦亡的经典途径就是这种依赖激活剂活化的炎症因子将 Caspase-1 活化而引起下游 IL-1 β 与 IL-18 的成熟与释放的途径^[5]。而细胞焦亡非经典途径则与之相反, Caspase-11 (在人类为 Caspase4/5) 的活化并不依赖炎症激活剂。IL-1 β 和 IL-18 的成熟与释放同样可由 Caspase-11 的活化诱发, 从而引起细胞焦亡。研究发现, 革兰阴性菌表面脂多糖成分为 Caspase-11 的天然受体, 而脂多糖 (LPS) 与 Caspase-11 相结合并将其激活是启动这一途径的必要条件。因细胞焦亡非经典途径在脓毒血症、内毒素血症等感染性疾病病程中发挥了重要作用, 近年来逐渐受到重视^[6]。

2 IRI

2.1 概念 IRI 是临床常见的并发症, 常发生于肝叶切除手术, 肝移植中因肝门阻断及其他因素引起的低血容量性休克后, 导致局部和远端细胞损伤和器官功能障碍。目前研究认为, IRI 的机制主要包括: 钙稳态的失调, 活性氧和氮的生成, 机体微环境的改变, Kupffer 细胞的活化, 补体的活化。这些机制均可导致各类损伤相关模式途径的激活, 从而造成肝脏组织及功能的损伤^[1]。其中, 已被证实 Kupffer 细胞的激活可引起 IRI。Kupffer 细胞可被活性氧、钙离子及革

兰阴性菌表面的 LPS 激活, 目前已知最强的激活物即为 LPS^[7-8]。而在肝脏缺血再灌注的过程中, 由于肠系膜上静脉淤血造成的肠道屏障功能受损, 再灌注时, 肠道内细菌移位入肝, 革兰阴性菌表面的 LPS 此时便可作为 Kupffer 细胞的激活物在 IRI 过程中发挥作用。Kupffer 细胞激活后会产生大量的炎症因子如 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、核因子 (NF)- κ B 等, 炎症因子可活化肝窦内皮细胞及肝实质细胞使其产生活性氧物质及表达黏附因子, 使白细胞、血小板黏附聚集, 使得微循环障碍发生。同时, 这些炎症因子还可激活自然杀伤性 T 淋巴细胞 (natural killer T cells, NKT)、中性粒细胞、CD4⁺ T 淋巴细胞, 造成肝组织损伤, 肝细胞死亡^[9-10]。

2.2 IRI 过程中与细胞焦亡相关的炎症因子

2.2.1 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体 是 NLR 家族中一种炎症蛋白, 在机体免疫反应和疾病发生过程, 尤其在细胞焦亡的经典途径中发挥着重要作用。ASC 和 Caspase 蛋白酶是其标志性组成结构, 当肝细胞受损时, PRRs 通过与 ASC 结合而将 NLRP3 激活, 使其发挥 Caspase 蛋白酶作用活化 Caspase-1, 由此启动了细胞焦亡的经典途径^[11-13]。在炎症反应对 IRI 中作用的研究表明, 在 IRI 模型中, NLRP3 缺陷小鼠明显表现出较少的中性粒细胞迁移和组织损伤, 肝功能得到一定的保护^[14]。

2.2.2 Caspase-1 与 Caspase-11 Caspase 是一个高度保守的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶家族。可分为参与并介导细胞凋亡发生的凋亡 Caspase, 包括: Caspase-2、Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10; 以及不参与细胞凋亡而是对 IL-1 β 前体有切割而使其活化成熟作用的炎症 Caspase, 包括: Caspase-1、Caspase-4、Caspase-5、Caspase-11。因此, 参与到细胞焦亡这一过程中的主要是 Caspase-1 与 Caspase-11 (人类为 Caspase-4/5)^[15-16]。

Caspase-1 是细胞焦亡途径中的特征性活化因子。在 IRI 过程中, Caspase-1 因活化的 NLRP3 发挥蛋白酶作用切割其前体将其活化, 从而诱发 IL-1 β 及 IL-18 的成熟与释放, 导致细胞焦亡的发生。HUSTED 等^[17]也研究证实, IRI 过程与 Caspase-1 介导引起 IL-1 β 、IL-18 成熟释放的细胞焦亡经典途径有关。

Caspase-11 是 IRI 过程中细胞焦亡非经典途径的重要启动因子^[12, 18-19]。KAYAGAKI 等^[20]发现, 存在一种依赖于 Caspase-11 活化 NLRP3 而使 IL-1 β 释放引起的细胞焦亡。后被称为细胞焦亡非经典途径, Caspase-11 被称为非经典炎症小体。在细胞核内, LPS 主要通过 TLR 通路激活肝脏固有 Kupffer 细胞, TLRs 被激活后, 经 MyD88 及其下游信号分子活化

NF- κ B, 研究发现, Caspase-11 基因的 5' 端上游启动子区域有多个 NF- κ B 结合位点。活化的 NF- κ B 可进入核内与 Caspase-11 基因上游的启动子结合, 使 Caspase-11 转录增加^[21-22]。另一方面, 在细胞质, LPS 通过内吞形式入胞, 与 Caspase-11 直接结合并将其激活^[23]。在内毒素模型中, Caspase-11^{-/-} 的小鼠被证明比野生型小鼠存活率高^[24]。在肝脏缺血再灌注的过程中存在一种有别于其他脏器缺血再灌注损伤的情况: 肝门的阻断造成门静脉高压, 肠系膜上静脉淤血, 肠壁血管通透性上升, 黏膜屏障功能受损, 再灌注时肠道菌移位入血, 经门静脉入肝, 造成内毒素血症对肝脏造成损伤。而肠道革兰阴性菌胞壁 LPS 成分就成了活化 Caspase-11, 启动 IRI 途径中细胞焦亡非经典途径的激动剂^[25-26]。

2.2.3 IL-1 β 与 IL-18 是单核细胞、内皮细胞等多种细胞在应答内外源性损伤时产生的细胞因子, 是细胞焦亡途径中最终活化并释放的特征性炎性因子。在 IRI 的过程中, 前体 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 经上游 Caspase-1 剪切并活化。活化后的 IL-1 β 与 IL-18 可激活中性粒细胞、NKT 细胞等免疫细胞, 引发炎症反应, 造成肝细胞损伤、死亡^[27-28]。

3 目前与细胞焦亡相关 IRI 的保护措施

IRI 是目前临床上肝叶切除、肝移植等手术中最常见的并发症, 其直接影响到手术治疗效果及术后患者的生存情况, 甚至可以引起其他脏器的损伤^[29]。Kupffer 细胞的活化被证明对 IRI 起到了启动作用, 因其活化引发的一系列炎性因子释放, 形成了启动 IRI 中细胞焦亡途径的必要条件^[28]。已知的最强 Kupffer 细胞激活物为 LPS。目前将 IRI 分为两相, I 相损伤由 Kupffer 细胞介导为主, 而 II 相损伤以中性粒细胞介导为主。I 相损伤是因 Kupffer 细胞激活释放大量的活性氧及细胞炎性因子造成的肝细胞急性损伤。II 相损伤发生于 I 相损伤之后, 是由于炎性因子的活化释放激活了炎性反应通路, 大量活化的中性粒细胞在肝脏内聚集、黏附, 不但能通过释放氧自由基、蛋白酶等对肝脏造成损害, 其聚集、黏附还可因阻塞肝窦造成肝窦狭窄, 加重肝脏微循环障碍, 引起肝细胞损害甚至损伤肝功能^[30]。目前没有发现对抗细胞焦亡的特异性药物, 因此, 通过抑制 Kupffer 细胞或抑制其释放的炎性因子, 以阻止其向 II 相损伤转化成为目前研究的热点。实验证明, Kupffer 细胞能被其特异性抑制剂三氯化钆(GdCl₃)抑制其活化, 从而降低包括 NLRP3、Caspase-1 在内的炎性因子的表达, 使得 IRI 减轻^[31]。另外在临床上, 麻醉药的预处理及缺血后处理已被证实对手术引起的缺血再灌注损伤有确切的保护作用。尤其是如异氟醚、七氟醚等卤代

类吸入麻醉药, 可通过抑制 Caspase-1、Caspase-11 及 IL-1 β 的活化表达对 IRI 起保护作用, 并且其起到的保护作用明显优于常用静脉麻醉药物^[32]。因此, 制订相关手术麻醉方案时, 选择卤代类吸入麻醉药作为围术期用药对肝功能进行保护已在临床上达成共识。

综上所述, IRI 过程中通过激活炎性因子引起细胞焦亡, 炎性因子作为将肝脏缺血再灌注与细胞焦亡连接起来的桥梁, 若可抑制其活化, 无疑可阻断细胞焦亡这一通路, 从而减轻 IRI。因此, 对细胞焦亡通路的干预调控和针对炎性因子的靶向抑制将可能为减轻 IRI 提供新的治疗方法。

参考文献

- [1] BAVARSAD K, RIAHI MM, SAADAT S, et al. Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the liver[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141: 53-62.
- [2] OSMAN A S, OSMAN A H, KAMEL M M. Study of the protective effect of ischemic and pharmacological preconditioning on hepatic ischemic reperfusion injury induced in rats[J]. *JGH Open*, 2017, 1(3): 105-111.
- [3] YUAN J, NAJAFOV A, PY B F. Roles of caspases in necrotic cell death[J]. *Cell*, 2016, 167(7): 1693-1704.
- [4] JORGENSEN I, RAYAMAJHI M, MIAO EA. Programmed cell death as a defence against infection[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(3): 151-164.
- [5] JIANG C, JIANG L, LI Q, et al. Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells[J]. *Toxicology*, 2018, 410: 26-40.
- [6] YI Y S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses[J]. *Immunology*, 2017, 152(2): 207-217.
- [7] REILING J, BRIDLE K R, GIJBELS M, et al. Low-Dose lipopolysaccharide causes biliary injury by blood biliary barrier impairment in a rat hepatic ischemia/reperfusion model[J]. *Liver Transpl*, 2017, 23(2): 194-206.
- [8] YUAN G, YU Y, JI L, et al. Down-Regulated receptor interacting protein 140 is involved in Lipopolysaccharide-Preconditioning-Induced inactivation of kupffer cells and attenuation of hepatic ischemia reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164217.
- [9] ADAK M, DAS D, NIYOGI S, et al. Inflammasome activation in Kupffer cells confers a protective response in nonalcoholic steatohepatitis through pigment epithelium-derived factor expression[J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): fj201800190.
- [10] ZHANG W J, FANG Z M, LIU W Q. NLRP3 inflammasome activation from Kupffer cells is involved in liver fi-

- brosis of *Schistosoma japonicum*-infected mice via NF- κ B [J]. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1):29.
- [11] QIU Z, LEI SQ, ZHAO B, et al. NLRP3 inflammasome Activation-Mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:9743280.
- [12] CHEN Y, QIN X, AN Q, et al. Mesenchymal Stromal Cells Directly Promote Inflammation by Canonical NLRP3 and Non-canonical Caspase-11 Inflammasomes[J]. *EBioMedicine*, 2018, 32:31-42.
- [13] MCGEOUGH M D, WREE A, INZAUGARAT M E, et al. TNF regulates transcription of NLRP3 inflammasome components and inflammatory molecules in cryopyrinopathies[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(12):4488-4497.
- [14] INOUE Y, SHIRASUNA K, KIMURA H, et al. NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes[J]. *J Immunol*, 2014, 192(9):4342-4351.
- [15] ZHAO Y, SHI J, SHAO F. Inflammatory caspases: activation and cleavage of gasdermin-D in vitro and during pyroptosis[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1714:131-148.
- [16] FENG S, FOX D, MAN S M. Mechanisms of gasdermin family members in inflammasome signaling and cell death [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430(18 Pt B):3068-3080.
- [17] HUSTED T L, LENTSCH A B. The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12 (23): 2867-2873.
- [18] DE CARVALHO R V H, ANDRADE W A, LIMA-JUNIOR D S, et al. Leishmania lipophosphoglycan triggers caspase-11 and the non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Rep*, 2019, 26(2):429-437.
- [19] CHEN N, OU Z B, ZHANG W F, et al. Cathepsin B regulates non-canonical NLRP3 inflammasome pathway by modulating activation of caspase-11 in Kupffer cells[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(6):e12487.
- [20] KAYAGAKI N, WARMING S, LAMKANFI M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11[J]. *Nature*, 2011, 479(7371):117-U146.
- [21] 罗炳生, 刘靖华. LPS 的胞内受体 Caspase-11 的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(3):289-296.
- [22] NIU X F, YAO Q, LI W F, et al. Harmine mitigates LPS-induced acute kidney injury through inhibition of the TLR4-NF-kappa B/NLRP3 inflammasome signalling pathway in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 849:160-169.
- [23] AN J, KIM S H, HWANG D, et al. Caspase-4 disassembles lipopolysaccharide micelles via LPS-CARD interaction[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):826.
- [24] KANG S J, WANG S, KUIDA K, et al. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(10):1115-1125.
- [25] LEE B L, STOWE I B, GUPTA A, et al. Caspase-11 auto-proteolysis is crucial for noncanonical inflammasome activation[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(9):2279-2288.
- [26] DENG M H, TANG Y T, LI W B, et al. The endotoxin delivery protein HMGB1 mediates caspase-11-Dependent lethality in sepsis[J]. *Immunity*, 2018, 49(4):740.
- [27] HONG S, YU J W. Prolonged exposure to lipopolysaccharide induces NLRP3-Independent maturation and secretion of interleukin (IL)-1beta in macrophages [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(1):115-121.
- [28] HUA S, MA M, FEI X, et al. Glycyrrhizin attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing HMGB1-dependent GSDMD-mediated kupffer cells pyroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 68:145-155.
- [29] ZHAO H L, HUANG H, ALAM A, et al. VEGF mitigates histone-induced pyroptosis in the remote liver injury associated with renal allograft ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(8):1890-1903.
- [30] 杨立群, 俞卫锋. 麻醉药预处理减轻肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(4):812-816.
- [31] XU Y, YAO J, ZOU C, et al. Asiatic acid protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inactivation of Kupffer cells via PPAR gamma/NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (49): 86339-86355.
- [32] WANG Z M, LV H, SONG S H, et al. Emulsified isoflurane preconditioning protects isolated rat kupffer cells against hypoxia/Reoxygenation-Induced injury [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(3):286-291.

(收稿日期:2019-01-18 修回日期:2019-04-26)