



GSDMD 介导的细胞焦亡在感染性疾病中的研究进展

刘瑞卿, 李胜玉, 申艳娜*

天津医科大学医学检验学院, 天津医科大学医学技术学院, 天津 300203

摘要: 细胞焦亡是细胞感染时由炎症小体介导, 以裂解细胞为特点的程序性死亡形式。其激活途径分为依赖半胱氨酸蛋白酶-1 或半胱氨酸蛋白酶-4/5/11 活化的经典与非经典途径。目前的研究表明细胞焦亡过程中主要效应蛋白是具有膜成孔活性的 gasdermin(也作 GSDM)家族成员。因此, 细胞焦亡也被称为 gasdermin 介导的程序性坏死。当宿主受到感染时, 细胞焦亡与宿主自身其他免疫防御机制存在互相调节机制, 保证宿主在清除感染的同时降低自身损伤程度。本文笔者将从研究最为广泛的 GSDMD 在细胞焦亡途径中的作用机制、细胞焦亡在感染性疾病中的研究进展以及细胞焦亡与其他程序性死亡在感染性疾病中的相互作用这三个方面作系统叙述, 期望为今后研究如何通过细胞焦亡途径治疗感染性疾病提供理论基础。

关键词: 细胞焦亡, gasderminD, 成孔活性, 半胱氨酸蛋白酶-1

近期, 细胞焦亡作为一种细胞程序性死亡方式得到越来越多的关注。当机体受到细菌、病毒等病原微生物感染时, 体内吞噬细胞如巨噬细胞、中性粒细胞可识别并清除感染物质。当宿主识别自身受损部位启动先天性免疫应答过程时则会触发细胞坏死、凋亡或焦亡。细胞焦亡是由炎症小体参与的依赖炎性半胱氨酸酶(caspase)的一种新的细胞程序性死亡方式。焦亡细胞同时具有凋亡和坏死的细胞特征, 主要表现为 Annexin V 染色阳性, 细胞核皱缩、细胞膜成孔, 进一步导致细

胞肿胀破裂、释放细胞内容物, 分泌炎性细胞因子, 引起炎症反应。因此细胞焦亡又称为细胞的炎性坏死^[1]。在感染过程中, 机体可通过激活炎症小体, 进而切割半胱氨酸酶-1(caspase-1)使其活化, 活化的 caspase-1 切割 gasderminD (GSDMD), 使其在胞膜上形成 gasdermin 孔; 同时活化的 caspase-1 可切割 IL-18 和 IL-1 β 的前体产生成熟的 IL-18 和 IL-1 β , 从 gasdermin 孔流出, 引起炎症反应。细胞内外物质通过 gasdermin 孔进行交换, 使细胞体积增大, 导致膜破裂, 完成清除感染细胞,

基金项目: 国家自然科学基金(81772252)

*通信作者。Tel/Fax: +86-20-83336080; E-mail: shenyanna@sina.com

收稿日期: 2019-01-14; 修回日期: 2019-04-19; 网络出版日期: 2019-05-20

破坏病原体的免疫应答过程,且焦亡过程还可清除已逃避炎症小体识别的感染细胞。例如,鼠伤寒沙门氏菌和单核细胞增生性李斯特菌引起宿主感染时,可通过表达特殊的鞭毛蛋白逃避宿主炎症小体的识别,从而在巨噬细胞内快速繁殖,引起更严重的感染过程^[2]。焦亡通过使细胞破裂来杀死感染细胞,而存在于细胞内已修饰过的细菌并没有因细胞裂解被杀死,它们仍存在于已焦亡的细胞的某个结构中,该结构称为孔诱导胞内陷阱(pore-forming intracellular trap, PIT)^[3]。在细胞焦亡过程中,破裂的感染细胞转化为 PIT,而 PIT 将质膜完整的细胞器和胞内活菌捕获在其内部,含菌的 PIT 增加了中性粒细胞趋化因子的数量^[4],损伤相关分子模式(damage associated molecular pattern, DAMP)和类花生酸等,使中性粒细胞或可能产生活性氧的巨噬细胞通过吞噬 PIT 来杀灭其中的细菌^[5]。

多名学者在研究焦亡过程中也曾推测在 caspase-1/11 的下游存在一种底物,该种底物具有膜成孔的活性。有实验室证明^[6]在细胞焦亡的非经典途径中,使用致死剂量的 LPS 刺激 GSDMD 敲除的骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDM),BMDM 并未出现焦亡现象,且成熟的 IL-1 β 分泌明显减少,证实 GSDMD 在 caspase-11 介导的非经典焦亡途径中发挥作用。

1 GSDMD 在细胞焦亡途径中的作用机制

1.1 GSDMD 及其家族成孔活性机制

Gasdermin 家族具有 45% 序列同源性,包括 gasderminA、B、C、D、E、DFNB59。除 DFNB59

缺失具有成孔活性的结构域以外,大部分都具有成孔活性^[7],且仅在成孔结构域(pore-forming domain, PFD)与抑制结构域(repressing domain, RD)间存在不同的连接物,而 PFD 是功能结构域,可诱导细胞焦亡,并形成 PIT。

研究表明,GSDMD 可在免疫细胞和肠上皮细胞中表达^[8],由含 242 个氨基酸的氨基末端结构域(即 N 端结构域, gasdermin 端, NT)通过一个含 43 个氨基酸的连接物与含 199 个氨基酸的碳末端结构域(即 C 端, CT)组成。NT 可以形成 gasdermin 孔^[9],因此 NT 也称为 PFD。但通常成孔活性被 C 端抑制,因此 C 端也称为 RD。早先研究^[10]发现了 GSDMA3 的晶体结构,其与 GSDMD 结构有高度相似性,该结构揭示了一个自我抑制机制。近期,该自抑机制得到进一步研究^[11]: gasdermin-N 端具有延伸的 β -折叠的核心结构, gasdermin-C 端为 α 4-螺旋球状褶皱,带有 caspase 切割位点的连接物通过一个口袋样结构将两个结构域末端结合在一起。在细胞焦亡过程中, caspase-1 或 caspase-4/5/11 被激活,活化的半胱氨酸蛋白酶在第 275 个氨基酸的位置切割连接物。当连接物被切割后, α 4-螺旋从口袋样结构中释放,使 NT 与 CT 断开,解除自抑制结构。NT 的成孔活性由此激活,大约 16 个 PFD 单体寡聚化可在细胞膜上形成一个直径在 10–15 nm 的孔^[12],最终引起膜肿胀破裂。在焦亡过程中,被 caspase-1 切割后的成熟 IL-1 β 、IL-18 也可通过 gasdermin 孔流出细胞,因而该孔也可作为蛋白质分泌通道。此外, GSDMD-NT 还可作用于线粒体,使线粒体产生较多的 ROS, ROS 进一步作用于炎症小体,激活其下游途径,引起促炎物质的分泌,起到免疫防御的作用^[13]。GSDMD 中成孔结构域 PFD 可被

caspase-3 切割并失活, 因而一旦 caspase-3 启动细胞凋亡, 则会抑制细胞焦亡^[14]。

1.2 GSDMD 孔介导两条细胞焦亡途径

细胞焦亡途径分为两种, 由 caspase-1 介导的经典细胞焦亡途径和由 caspase-11 (人类同源的炎性半胱氨酸蛋白酶为 caspase-4/5)介导的非经典细胞焦亡途径。细胞受到不同刺激时, 可激活不同的半胱氨酸蛋白酶, 如 LPS 激活 caspase-11, ATP、细菌鞭毛、孔形成毒素等可激活 caspase-1, 最终 caspase 酶均通过切割 GSDMD 蛋白, 解除它的自抑制结构, 启动细胞焦亡通路^[15-16]。两种途径不同之处在于, caspase-1 不仅可切割 GSDMD 蛋白, 还可切割 pro-IL-1 β , 形成成熟的 IL-1 β ; 而 caspase-11 仅切割 GSDMD 蛋白, 使胞膜成孔, 刺激 K⁺流出, 进而激活 NLRP3 炎症小体, 活化 caspase-1, 产生成熟的 IL-1 β 。

在焦亡途径中有两个关键成分, 炎症小体和 GSDMD。LPS、细菌、病毒等病原相关分子模式和 ATP 等损伤相关分子模式均可激活炎症小体。炎症小体由多个蛋白构成, 其中包括 NLR 蛋白、接头蛋白 ASC 和炎性半胱氨酸蛋白酶-1 蛋白^[17]。炎症小体通过 NLR 蛋白识别上游信号后, 活化 caspase-1, 将信号传递至下游执行蛋白 GSDMD, 其 N 端的抑制结构被解除, 在细胞膜上形成 gasdermin 孔。该孔打破了正常质膜的渗透屏障, 中断正常钠、钾离子交换, 由浓度梯度驱动的力量使钾离子流向细胞外去中和电子, 钠离子也依靠其浓度梯度和电梯度被大量吸引进入细胞, 进而使大量水进入细胞, 导致细胞体积增大。

若细胞膜上存在少量 gasdermin 孔, 细胞则会启动补偿机制去减小细胞体积。其中包括由于细胞肿胀激活的 K⁺、Cl⁻通道, 该通道可促进胞内溶

质及水流出细胞^[18]。且细胞内高尔基体被激活, 发挥紧急胞吐作用, 胞吐小泡的膜与细胞膜融合, 修补含孔的膜, 则不会进一步引起细胞焦亡^[19]。若细胞膜仍存在大量 gasdermin 孔, 则细胞补偿机制失效, 细胞体积继续增大。一旦体积增大到超过细胞膜承受能力, 胞膜分离, 形成一个个充满液体的小体, 此后细胞膜破裂, 触发细胞焦亡, 大量内容物及白介素释放至细胞外, 扩大炎症反应^[3]。此外, 在细胞焦亡期间, caspase-1 切割 GSDMD 同时切割 IL-1 β 及 IL-18 前体, 以在细胞膜破裂之前产生成熟细胞因子。IL-1 β (4.5 nm)和 IL-18 (5.0 nm)可通过 gasdermin 孔(10-15 nm)释放到胞外^[12], 这也解释了在细胞裂解前可在胞外观察到 IL-1 β 和 IL-18 的现象^[11]。

1.2.1 经典细胞焦亡途径: 最初研究认为^[20] NLRP3 可被 ATP 和某些细菌毒素直接激活。经过深入探讨发现这些微生物产物, 内源性分子和颗粒物并不是直接激活该通路^[21-23], 而是通过激活 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)等来激活 NLRP3^[24], 进而活化下游分子。目前 He 等^[25]提出的 NLRP3 激活的双信号模型已被接受。在该模型中, 一信号启动是通过 TLR 等受体接受微生物或内源性分子刺激, 激活 NF- κ B 通路, 诱导 NLRP3 活化及 pro-IL-1 β 表达; 二信号是通过 ATP、成孔毒素、病毒 RNA 或颗粒物质等进一步激活 NLRP3, 随后 NLRP3 通过 ASC 与 caspase-1 连接形成一个多蛋白复合物, 进而 caspase-1 发生自剪切过程形成活化的 caspase-1, 活化的 caspase-1 切割 GSDMD 以及白介素前体, 使白介素前体变为有活性的白介素(IL-1 β 、IL-18)并解除 GSDMD 的结构自抑性, GSDMD-NT 在细胞膜上成孔导致细胞焦亡, 释放内容物及白介素引起炎症反应。本

文通讯作者参与的研究发现, Syk 和 JNK 参与调控 ASC 磷酸化过程, 通过影响 ASC 斑点蛋白形成来调控 NLRP3 及 AIM2 炎症小体的活化^[26]。

1.2.2 非经典的细胞焦亡途径: 除 caspase-1, 鼠源巨噬细胞中 caspase-11 (人源中的 caspase-4/5) 也可以在胞内作为受体特异性结合 LPS。大肠埃希菌、鼠伤寒沙门菌和福氏志贺菌等多种革兰阴性菌的 LPS 通过 TLR4 递送到胞质中并激活 caspase-11^[27]。活化的 caspase-11 可裂解 GSDMD^[28-29], 使 GSDMD 的 N 端活化引起细胞焦亡; 同时活化的 caspase-11 开启 pannexin-1 通道, 诱导 K⁺ 外流, 激活 NLRP3 炎症小体, 促进 IL-1 β 释放。此外, ATP 还可通过被切割的 pannexin-1 区域以自分泌或旁分泌方式与 P2X7 受体结合, 打开 P2X7 孔, 促进焦亡^[30]。炎症小体虽参与了非经典途径, 但并未直接参与细胞焦亡过程, 而是通过炎性的半胱氨酸酶切割

GSDMD, 使其具有成孔活性而引起细胞程序性死亡。具体通路见图 1。

2 GSDMD 在感染性疾病中的作用

在感染性疾病中, 细胞焦亡是机体重要免疫防御机制, 在清除病原体感染及内源性危险信号时发挥重要作用, 也为疾病的治疗提供新的治疗靶位^[31]。

目前, 已有多种研究证明炎症小体参与细菌的清除过程。例如产单核细胞李斯特菌, 该菌是一种引起人畜共患病的革兰阳性细胞内寄生菌, 它可以利用巨噬细胞的吞噬功能入侵宿主巨噬细胞, 分泌李斯特菌溶血素介导细菌逃离吞噬体, 并在巨噬细胞胞浆内复制。进入胞质的产单核细胞李斯特菌可激活细胞内 Ca²⁺ 信号通路, 进一步诱

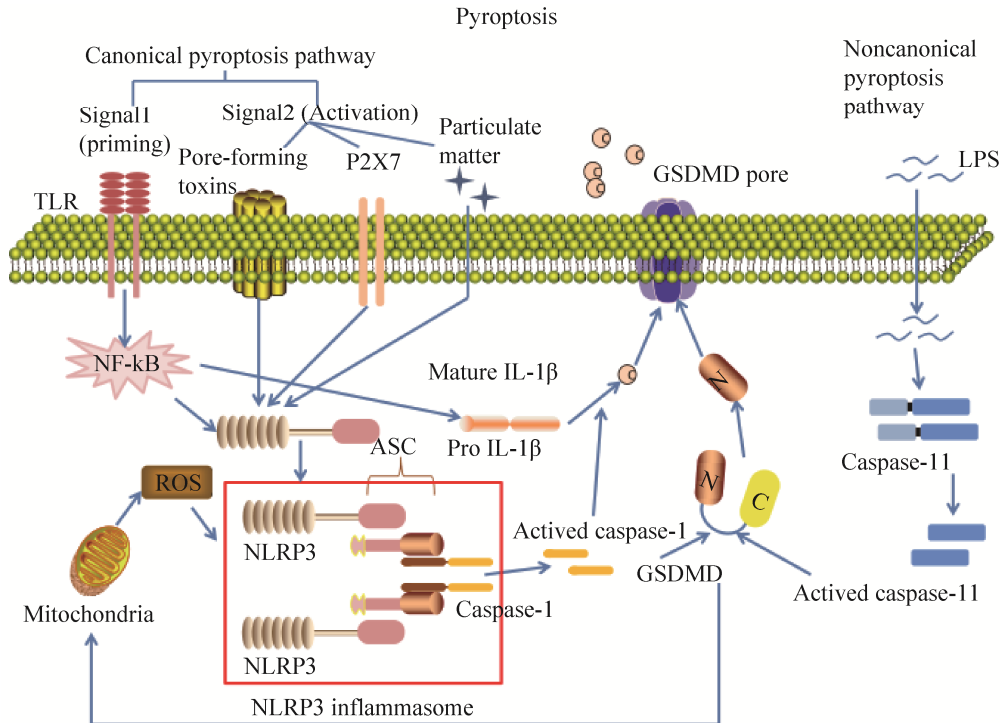


图 1. 细胞焦亡通路

Figure 1. Pyroptosis pathway.

导 IL-1 α 成熟、分泌, 启动机体免疫防御机制^[32]。本课题组证明^[33], 当产单核细胞李斯特菌感染小鼠巨噬细胞时, Syk 可通过调控 ASC-依赖的炎症小体的活化来调节 IL-18 的生成。且另有研究证明^[21], 在产单核细胞李斯特菌感染机体时, caspase-1 可通过 NLRP3-ASC 途径被激活, 将 IL-1 β 和 IL-18 前体切割为有活性的 IL-1 β 和 IL-18, 从而激活宿主产生免疫应答, 引起炎症反应, 且被杀死细胞呈现焦亡特征。本文通讯作者参与的研究^[34]还证明, AIM2 炎症小体也参与了产单核细胞增生李斯特菌感染时 caspase-1 的活化。而在 AIM2 敲除组中, caspase-11 被活化, 同样也发生了焦亡现象, 说明在 AIM2 不存在的情况下, 还存在其他的补偿机制来执行焦亡信号^[35-36]。AIM2 与 NLRP3 在李斯特菌感染巨噬细胞时共同发挥重要作用, 他们是通过激活 caspase-1/11 来引起细胞焦亡。而焦亡发生是由 GSDMD 参与的。为了证实 GSDMD 在感染中的作用, 刘星等^[9]构建了 GSDMD-NT、4A-mutant GSDMD-NT、GSDMD-CT、GSDMD 四种构建体, 分别设立大肠杆菌感染组以及金黄色葡萄球菌感染组, 5 min 后发现 GSDMD-NT 组强烈抑制两种细菌的集落形成, 说明 GSDMD-NT 具有抗菌作用。为了进一步确定 GSDMD-NT 是否还具有杀菌作用, 研究人员再次用以上四种构建体处理了大肠杆菌感染组及李斯特菌感染组, 20 min 后, GSDMD-NT 组中约 80% 的细菌被杀死。且用负染色电镜可观察到, 只有当 GSDMD 与 caspase-11 同时存在并结合的情况下, 才会出现细胞膜破裂的现象。

并且该研究^[9]还证明 GSDMD-NT 可结合含有心磷脂(存在于细菌膜的内外小叶中)、磷脂酰肌醇磷酸酯及磷脂酰丝氨酸(限于细胞膜内小叶)的膜,

形成寡聚孔, 将胞内物质释放到细胞外环境中。GSDMD-NT 可选择性结合细胞膜内层的磷脂, 因此在焦亡过程中只能从胞质内表面形成孔, 并保护相邻正常细胞免受 GSDMD 对膜的成孔作用。GSDMD-NT 还可限制活菌从感染细胞中释放并减少感染的扩散。由于吞噬体外小叶是来源于质膜的内部小叶, 因此吞噬体还可被 GSDMD-NT 靶向, 为吞噬体内细菌提供了条件。而 GSDMD-NT 是否仅对从吞噬体逃逸的细菌有活性还不清楚。

在金黄色葡萄球菌感染中, Miller 等^[37]证明在缺乏 IL-1R、IL-1 β 或 ASC 的小鼠中, 皮肤感染部位嗜中性粒细胞明显减少, 并且金黄色葡萄球菌在这些部位生长更快。随后 Accarias 等^[38]在研究中发现金黄色葡萄球菌感染时, 其毒素可以触发依赖炎症小体的细胞死亡程序, 呈现焦亡的所有特征。这一结果证实了金黄色葡萄球菌 α -毒素激活巨噬细胞中炎症小体, 使机体发挥免疫作用。Shimada 等^[39]在研究中也发现巨噬细胞吞噬体中细菌细胞壁的降解与炎症小体的活化及 IL-1 β 分泌有关, 这将为金黄色葡萄球菌感染性疾病的诊疗提供新的靶标。

此外, 在其他细菌感染过程中也被证明存在焦亡现象, 如志贺杆菌, 一种革兰阴性短小杆菌。早在 1992 年就有研究发现^[40]志贺杆菌可以诱导巨噬细胞发生程序性死亡。后来发现这种死亡方式是由 caspase-1 介导的, 证明了这种程序性死亡并不是凋亡。随研究深入, 有研究证明^[41]志贺杆菌诱导的细胞程序性死亡还伴随细胞膜通透性改变、核固缩、IL-1 β 分泌增多, 具有细胞焦亡特征。近期研究发现^[42], 革兰阴性菌产生的脂多糖由一囊泡状结构包绕, 该结构称为外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)。OMVs 可通过内吞作

用进入到胞质内,进而激活 caspase-11,引起细胞焦亡。这也进一步说明了,非入侵的细菌也可以激活机体启动细胞焦亡免疫防御机制。

由此可见,GSDMD 作为细胞焦亡途径中的主要执行者,在细菌感染性疾病中发挥着重要作用。它可在细胞膜上成孔,引起细胞内外物质交换,将炎性细胞因子分泌至细胞外,同时使细菌困于感染细胞中,从而被中性粒细胞等吞噬细胞清除。

除细菌感染可诱发细胞焦亡外,一些病毒感染^[43],如人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV),也引起细胞焦亡。HIV 感染可激活炎症小体。HIV 可通过淋巴组织入侵静息的 CD4⁺T 细胞,并进行逆转录,此转录过程可被 DNA 传感器 IFI16 识别,从而激活炎症小体,进而活化 caspase-1,引起细胞焦亡^[44]。然而 GSDMD 在此过程中发挥的作用还未得到进一步证实。

在真菌感染中,如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)也可观察到由 caspase-1/11 启动的免疫防御机制。烟曲霉^[45]可在 THP1 细胞中激活 NLRP3 炎症小体,在小鼠骨髓来源树突状细胞中激活 AIM2 和 NLRP3 炎症小体,进而分泌成熟的 IL-1 β 、IL-18。然而在真菌感染过程中是否可以触发由 caspase-1 介导的 GSDMD 参与的细胞焦亡过程还需进一步研究。

3 细胞焦亡与其他细胞程序性死亡机制在感染性疾病中的相互作用

在机体感染过程中,焦亡作为一种程序性死亡方式,并不是单独发挥作用,而是与其他机制互相牵制来达到清除感染物质的目的。

3.1 凋亡与焦亡的相互作用

细胞凋亡是细胞程序性死亡方式之一,由细胞外死亡受体途径和细胞内线粒体死亡途径共同调节,坏死的溶解物质会引起细胞内损伤相关分子模式的释放,从而引起炎症。主要表现为细胞固缩、染色质和细胞质浓缩、核破裂,最终形成凋亡小体^[46],被周围的巨噬细胞吞噬,导致细胞死亡。

目前很多研究发现,当机体不能有效清除凋亡细胞时,已凋亡细胞会进一步发生继发性坏死,表现为凋亡细胞的质膜完整性逐渐丧失的过程。继发性坏死一直被认为是自发不受调控的过程,但最近研究表明^[47],DFNA5 可被 caspase-3 切割,进一步引发凋亡细胞的继发性坏死。切割后的 DFNA5 (GSDME)释放出 N 末端片段,使凋亡细胞的胞膜成孔,进而发生类似于细胞焦亡的细胞坏死。在化疗药治疗下,caspase-3 切割 DFNA5 诱导的细胞死亡速度比细胞凋亡更快,且该实验室证明,GSDME 在大多数癌细胞中的表达量明显低于许多正常组织。GSDME 的表达水平是否决定细胞的死亡形式以及焦亡和凋亡后的继发性坏死如何调节,还需进一步研究。此外,当机体受到外源性刺激时,线粒体活性氧产生增多,引起 JNK 磷酸化,BaX 蛋白产生增多,进而触发细胞凋亡。该途径也可引起 caspase-3/9 活化,从而切割 GSDME,触发细胞焦亡,但细胞焦亡与细胞凋亡之间的相互关系尚不明确^[48]。细胞焦亡和细胞凋亡是否同时发生在感染性疾病中及相互作用关系尚需进一步探讨。

还有一项研究表明^[49],在敲除了 GSDMD 的单核细胞中,LPS 与尼日利亚菌素确实诱导细胞发生凋亡。且该实验室还证明炎症小体和

caspase-1 可激活 caspase-3/7, 从而阻断细胞焦亡。但激活 caspase-3/7 诱发的细胞死亡速度比切割 GSDMD 诱导细胞焦亡过程更慢。由此得出一个猜想, 炎症小体和 caspase-1 激活 caspase-3/7 引起细胞凋亡后的继发性坏死不仅可以确保感染细胞被消除, 还可作为反监管机制抑制细胞焦亡和炎症。因此焦亡与细胞凋亡间的相互作用还有待研究。

3.2 坏死性凋亡与焦亡的平衡作用

坏死性凋亡是细胞主动死亡过程, 是依赖受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1) 及受体相互作用蛋白激酶 3 (receptor-interacting protein kinase 3, RIPK3) 磷酸化, 使磷酸混合谱系激酶结构域 (mixed lineage kinase domain-like, MLKL) 寡聚化后激活的程序性死亡机制^[50]。在坏死性凋亡过程中, TNF 受体 1 识别 TNF (细胞凋亡和坏死性凋亡的诱导因子), 随后 TNF 受体 1 三聚化, 募集衔接蛋白 TRADD (通过 DD 相关的 TNF 受体)、TRAF2 (TNF 受体相关因子 2) 和 RIPK1 形成复合体 I (TRADD-TRAF2-RIPK1)。复合体 I 中几种组分重新形成细胞溶质复合体 (也称复合体 II), 并通过 DD 介导的相互作用募集 FADD, 随后 FADD 招募 caspase-8 而 RIPK1 招募 RIPK3^[51]。RIPK1-RIPK3 相互作用可招募更多 RIPK3 分子来促进 RIPK1-RIPK3 同源相互作用, 并诱导 RIPK3 发生磷酸化^[52], 自磷酸化的 RIPK3 进一步使 MLKL 发生磷酸化, 且 MLKL 的 N 端可直接与心磷脂或其他几种磷脂酰肌醇磷酸盐 (PIPS) 相互作用, 利于与质膜融合。最新研究表明^[53], 磷酸化后的 MLKL 可形成八聚体结构, 跨越质膜引起膜破裂, 引起细胞溶胀和溶解^[54]。

当细菌感染机体后会产生孔形成毒素 (pore-

forming toxin, PFT), MLKL 在细胞膜上成孔并使细胞内容物释放到胞外引起炎症反应。与由 caspase-1 介导的细胞焦亡相似, 坏死性凋亡也是通过释放胞内物质促进炎症的发生, 但坏死性凋亡是由 TLRs 或 TNFR 或 IFNAR 受体识别病原物质来激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路引起的一种程序性死亡方式^[55]。Kitur 等^[56]通过一系列实验表明, 在感染过程中, 焦亡促进了金黄色葡萄球菌的清除, 而坏死性凋亡可促进被感染细胞的清除, 从而抑制过量的炎症表达。他们通过建立小鼠感染模型以及化脓性感染模型证明在 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路中, MLKL 可以清除感染部位的金黄色葡萄球菌, 抑制 RIPK1 会破坏机体的清除能力并且加重炎症反应。RIPK3 作为 RIPK1 的下游因子和坏死性凋亡的主要调控因子^[57], 它可以直接活化坏死性凋亡途径并刺激 NLRP3 炎症小体产生 IL-1 β ^[58], 相反, 通过抑制 RIPK3 减弱坏死性凋亡的作用, 可增强金黄色葡萄球菌的清除, 但这将引起更严重的炎症反应。并且研究发现^[59]当缺乏 caspase-1/4 时, 会加重机体感染程度。caspase-1 介导的细胞焦亡在感染中起到清除感染菌的作用, 而体内存在的坏死性凋亡和细胞焦亡途径共同作用会提高感染后的生存率。最新报道提出, 坏死性凋亡引起细胞死亡通过限制细胞因子的产生起到免疫抑制的作用^[60]。当机体感染时, 过量的炎症反应反而会增加发病率和死亡率^[61], 因此坏死性凋亡是机体防御系统中限制炎症过表达的重要组成部分。

4 展望

细胞焦亡是一种依赖于 caspase-1 和/或 caspase-11 并且具有促炎性质的程序性细胞死亡,

是机体在清除病原感染和收到内源危险信号刺激时的重要免疫防御反应。研究显示 GSDMD 是细胞焦亡过程中的关键物质,但其下游产物与细胞发生焦亡的关系仍有待研究。焦亡作为一种细胞的自我调控程序,是机体一种抵制内、外源刺激的有力机制,然而在某些条件下焦亡过度激活,反而会加重炎症反应,导致相关疾病的发生和发展。因此对于细胞焦亡影响因素及激活机制的深入研究,有助于进一步揭示细胞焦亡所涉及的分子机制,利于了解临床上与细胞焦亡相关疾病的发生机制,为相关疾病的治疗提供全新的药物靶点。

参考文献

- [1] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(2): 99–109.
- [2] Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(3): 151–164.
- [3] Jorgensen I, Zhang Y, Krantz BA, Miao EA. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, 2016, 213(10): 2113–2128.
- [4] Jorgensen I, Lopez JP, Laufer SA, Miao EA. IL-1 β , IL-18, and eicosanoids promote neutrophil recruitment to pore-induced intracellular traps following pyroptosis. *European Journal of Immunology*, 2016, 46(12): 2761–2766.
- [5] von Moltke J, Trinidad NJ, Moayeri M, Kintzer AF, Wang SB, van Rooijen N, Brown CR, Krantz BA, Leppla SH, Gronert K, Vance RE. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome *in vivo*. *Nature*, 2012, 490(7418): 107–111.
- [6] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu JS, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang YF, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015, 526(7575): 666–671.
- [7] Shi JJ, Zhao Y, Wang K, Shi XY, Wang Y, Huang HW, Zhuang YH, Cai T, Wang FC, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015, 526(7575): 660–665.
- [8] Saeki N, Usui T, Aoyagi K, Kim DH, Sato M, Mabuchi T, Yanagihara K, Ogawa K, Sakamoto H, Yoshida T, Sasaki H. Distinctive expression and function of four GSDM family genes (GSDMA-D) in normal and malignant upper gastrointestinal epithelium. *Genes Chromosomes & Cancer*, 2009, 48(3): 261–271.
- [9] Liu X, Zhang ZB, Ruan JB, Pan YD, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 2016, 535(7610): 153–158.
- [10] Lamkanfi M, Kanneganti TD, Van Damme P, Vanden Berghe T, Vanoverberghe I, Vandekerckhove J, Vandenabeele P, Gevaert K, Núñez G. Targeted peptide-centric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2008, 7(12): 2350–2363.
- [11] He WT, Wan HQ, Hu LC, Chen PD, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han JH. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Research*, 2015, 25(12): 1285–1298.
- [12] Ding JJ, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi JJ, Sun HZ, Wang DC, Shao F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 2016, 535(7610): 111–116.
- [13] Platnich JM, Chung H, Lau A, Sandall CF, Bondzi-Simpson A, Chen HM, Komada T, Trotman-Grant AC, Brandelli JR, Chun J, Beck PL, Philpott DJ, Girardin SE, Ho M, Johnson RP, MacDonald JA, Armstrong GD, Muruve DA. Shiga Toxin/Lipopolysaccharide activates caspase-4 and Gasdermin D to trigger mitochondrial reactive oxygen species upstream of the NLRP3 inflammasome. *Cell Reports*, 2018, 25(6): 1525–1536.e7.
- [14] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature Communications*, 2017, 8: 14128.
- [15] Man SM, Kanneganti TD. Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis. *Cell Research*, 2015, 25(11): 1183–1184.
- [16] Broz P. Caspase target drives pyroptosis. *Nature*, 2015, 526(7575): 642–643.

- [17] Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, Stacey KJ. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(3): 319–326.
- [18] Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews*, 2009, 89(1): 193–277.
- [19] Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, Divoux S, Piel M, Perez F. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 2014, 343(6174): 1247136.
- [20] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, 440(7081): 228–232.
- [21] Sha WW, Mitoma H, Hanabuchi S, Bao MS, Weng LY, Sugimoto N, Liu Y, Zhang ZQ, Zhong J, Sun B, Liu YJ. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2014, 111(45): 16059–16064.
- [22] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Ozkurede U, Kim YG, Chakrabarti A, Gale M Jr, Silverman RH, Colonna M, Akira S, Núñez G. Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K⁺ efflux. *Journal of Immunology*, 2014, 193(8): 4214–4222.
- [23] Dowling JK, O'Neill LAJ. Biochemical regulation of the inflammasome. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 47(5): 424–443.
- [24] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu JH, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-κB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of Immunology*, 2009, 183(2): 787–791.
- [25] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(12): 1012–1021.
- [26] Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang RD, Hernandez-Cuellar E, Shen YN, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mitsuyama M. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nature Immunology*, 2013, 14(12): 1247–1255.
- [27] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 2014, 157(5): 1013–1022.
- [28] Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation. *Journal of Cell Biology*, 2016, 213(6): 617–629.
- [29] Aglietti RA, Estevez A, Gupta A, Ramirez MG, Liu PS, Kayagaki N, Ciferri C, Dixit VM, Dueber EC. GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2016, 113(28): 7858–7863.
- [30] Yang DH, He Y, Muñoz-Planillo R, Liu Q, Núñez G. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. *Immunity*, 2015, 43(5): 923–932.
- [31] Maltez VI, Tubbs AL, Cook KD, Aachoui Y, Falcone EL, Holland SM, Whitmire JK, Miao EA. Inflammasomes coordinate pyroptosis and natural killer cell cytotoxicity to clear infection by a ubiquitous environmental bacterium. *Immunity*, 2015, 43(5): 987–997.
- [32] Dewamitta SR, Nomura T, Kawamura I, Hara H, Tsuchiya K, Kurenuma T, Shen YN, Daim S, Yamamoto T, Qu HX, Sakai S, Xu YT, Mitsuyama M. Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1α secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 1884–1894.
- [33] Liu QQ, Liu YD, Zhang Q, Li X, Feng XM, Liu XC, Di BH, Shen YN. The role of syk in the inflammasome activation during listeria monocytogenes infection. *Tianjin Medical Journal*, 2014, 42(5): 432–435. (in Chinese)
刘倩倩, 刘运德, 张琼, 李雪, 冯香梅, 刘晓春, 邸宝华, 申艳娜. Syk 调控单增李斯特菌感染中炎症复合体的活化. *天津医药*, 2014, 42(5): 432–435.
- [34] Tsuchiya K, Hara H, Kawamura I, Nomura T, Yamamoto T, Daim S, Dewamitta SR, Shen YN, Fang RD, Mitsuyama M. Involvement of absent in melanoma 2 in inflammasome activation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Immunology*, 2010, 185(2): 1186–1195.
- [35] Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nature Immunology*, 2010, 11(5): 385–393.
- [36] Rathinam VAK, Jiang ZZ, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E,

- Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature Immunology*, 2010, 11(5): 395–402.
- [37] Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, Hirano K, Rao S, Lin HP, O'Connell RM, Iwakura Y, Cheung AL, Cheng GH, Modlin RL. Inflammasome-mediated production of IL-1 β is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *Journal of Immunology*, 2007, 179(10): 6933–6942.
- [38] Accarrias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, Neyrolles O, Boullier S, Tabouret G. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. *European Journal of Immunology*, 2015, 45(3): 794–806.
- [39] Shimada T, Park BG, Wolf AJ, Brikos C, Goodridge HS, Becker CA, Reyes CN, Miao EA, Aderem A, Götz F, Liu GY, Underhill DM. *Staphylococcus aureus* evades lysozyme-based peptidoglycan digestion that links phagocytosis, inflammasome activation, and IL-1 β secretion. *Cell Host & Microbe*, 2010, 7(1): 38–49.
- [40] Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 1992, 358(6382): 167–169.
- [41] Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Inohara N, Sasakawa C, Nuñez G. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathogens*, 2007, 3(8): e111.
- [42] Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, Rathinam VAK. Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. *Cell*, 2016, 165(5): 1106–1119.
- [43] Lupfer C, Kanneganti TD. The expanding role of NLRs in antiviral immunity. *Immunological Reviews*, 2013, 255(1): 13–24.
- [44] Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang ZY, Monroe KM, Zepeda O, Hunt PW, Hatano H, Sowinski S, Muñoz-Arias I, Greene WC. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 2014, 505(7484): 509–514.
- [45] Karki R, Man SM, Malireddi RKS, Gurung P, Vogel P, Lamkanfi M, Kanneganti TD. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. *Cell Host & Microbe*, 2015, 17(3): 357–368.
- [46] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4): 239–257.
- [47] Wang YP, Gao WQ, Shi XY, Ding JJ, Liu W, He HB, Wang K, Shao F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 2017, 547(7661): 99–103.
- [48] Yu JH, Li S, Qi J, Chen ZL, Wu YH, Guo J, Wang K, Sun XJ, Zheng JB. Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(3): 193.
- [49] Taabazuing CY, Okondo MC, Bachovchin DA. Pyroptosis and apoptosis pathways engage in bidirectional crosstalk in monocytes and macrophages. *Cell Chemical Biology*, 2017, 24(4): 507–514.e4.
- [50] González-Juarbe N, Gilley RP, Hinojosa CA, Bradley KM, Kamei A, Gao GL, Dube PH, Bergman MA, Orihuela CJ. Pore-forming toxins induce macrophage necroptosis during acute bacterial pneumonia. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(12): e1005337.
- [51] Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, Dong MQ, Han JH. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 2009, 325(5938): 332–336.
- [52] Wu XN, Yang ZH, Wang XK, Zhang Y, Wan H, Song Y, Chen X, Shao J, Han J. Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2014, 21(11): 1709–1720.
- [53] Huang DL, Zheng XR, Wang ZA, Chen X, He WT, Zhang YR, Xu JG, Zhao H, Shi WK, Wang X, Zhu YQ, Han JH. The MLKL channel in necroptosis is an octamer formed by tetramers in a dyadic process. *Molecular and Cellular Biology*, 2017, 37(5): e00497–16.
- [54] Cai ZY, Jitkaew S, Zhao J, Chiang HC, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu LG, Liu ZG. Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nature Cell Biology*, 2014, 16(1): 55–65.
- [55] Chan FKM, Luz NF, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annual Review of Immunology*, 2015, 33: 79–106.
- [56] Kitur K, Wachtel S, Brown A, Wickersham M, Paulino F, Peñaloza HF, Soong G, Bueno S, Parker D, Prince A. Necroptosis promotes *Staphylococcus aureus* clearance by inhibiting excessive inflammatory signaling. *Cell Reports*,

- 2016, 16(8): 2219–2230.
- [57] Christofferson DE, Li Y, Yuan JY. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annual Review of Physiology*, 2014, 76: 129–150.
- [58] Newton K, Sun XQ, Dixit VM. Kinase RIP3 is dispensable for normal NF- κ Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and toll-like receptors 2 and 4. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(4): 1464–1469.
- [59] Kearney CJ, Cullen SP, Tynan GA, Henry CM, Clancy D, Lavelle EC, Martin SJ. Necroptosis suppresses inflammation via termination of TNF- or LPS-induced cytokine and chemokine production. *Cell Death and Differentiation*, 2015, 22(8): 1313–1327.
- [60] Stephenson HN, Herzig A, Zychlinsky A. Beyond the grave: when is cell death critical for immunity to infection. *Current Opinion in Immunology*, 2016, 38: 59–66.
- [61] Kitur K, Parker D, Nieto P, Ahn DS, Cohen TS, Chung S, Wachtel S, Bueno S, Prince A. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004820.

GSDMD-mediated pyroptosis in infectious diseases

Ruiqing Liu, Shengyu Li, Yanna Shen*

School of Laboratory Medicine, School of Medical Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China

Abstract: Pyroptosis is a form of inflammasome-mediated cell programmed death which exhibits cell lysis upon infection. The activation pathway is divided into canonical pathway via caspase-1 activation and noncanonical pathway via caspase-4/5/11 activation. Recent studies have shown that main effector proteins in pyroptosis are gasdermin (also known as GSDM) family members bearing a novel membrane pore-forming activity. Therefore, pyroptosis is also defined as a cell programmed death mediated by gasdermin. There is cross-regulation between pyroptosis and other immune defense mechanisms so that the host clears infection and relieves damage extent during infection. This review focuses on the function of GSDMD in pyroptosis, research progress of pyroptosis in infectious diseases, and the interaction between pyroptosis and other cell programmed death upon infection. We hope that this review can provide a theoretical basis for the treatment of infectious diseases by targeting pyroptosis.

Keywords: pyroptosis, gasderminD, pore-forming activity, caspase-1

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81772252)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-83336080; E-mail: shenyanna@sina.com

Received: 14 January 2019; Revised: 19 April 2019; Published online: 20 May 2019