



细胞焦亡在黄病毒致病机制中的作用

张琛, 宋正然, 王培刚*

首都医科大学基础医学院, 病原生物学系微生物教研室, 北京 100069

张琛, 宋正然, 王培刚. 细胞焦亡在黄病毒致病机制中的作用. 微生物学报, 2022, 62(2): 476–488.

Zhang Chen, Song Zhengran, Wang Peigang. Research progress on the role of pyroptosis in flavivirus infection. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 476–488.

摘要: 黄病毒(flavivirus)是一类具有包膜的单股正链 RNA 病毒, 经蚊虫叮咬传播, 是新发突发传染性疾病的重要病原体, 严重威胁着人类健康。尽管不同黄病毒引起的临床疾病不同, 但是它们的临床症状却有一些相似之处, 发热是黄病毒感染后最常见的症状, 而且往往表现为高热。研究发现, 寨卡病毒和日本脑炎病毒感染中存在胱天蛋白酶 1 (caspase1) 依赖的炎症反应, 而这一过程与细胞焦亡(pyroptosis)的部分机制相吻合。细胞焦亡是一种依赖于胱天蛋白酶(caspases)的炎症细胞程序性死亡类型, 其特征有焦孔素(gasdermin)介导的孔形成、细胞肿胀破裂和炎症细胞因子释放。本文对黄病毒感染引起的固有免疫中巨噬细胞的焦亡现象进行综述, 对细胞焦亡的分子机制、细胞焦亡的重要组分作用进行总结, 分析了细胞焦亡与代表性黄病毒之间的关系, 以期细胞焦亡在黄病毒致病机制的后续研究提供参考, 为抗病毒感染治疗提供新的思路。

关键词: 黄病毒; 病毒感染; 细胞焦亡; 半胱天冬酶; 焦孔素 D

基金项目: 国家自然科学基金(81871641, 81972979, 81902048); 国家自然科学基金-云南联合基金(U1902210); 北京市教委重点项目(KZ201810025035)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81871641, 81972979, 81902048), by the National Natural Science Foundation of China-Joint Fund of Yunnan Province (U1902210) and by the Beijing Education Committee Key Program (KZ201810025035)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-83911688; E-mail: pgwang@ccmu.edu.cn

Received: 31 May 2021; Revised: 27 August 2021; Published online: 11 October 2021

Research progress on the role of pyroptosis in flavivirus infection

ZHANG Chen, SONG Zhengran, WANG Peigang*

Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Flaviviruses are a group of single-stranded positive-sense RNA viruses with envelope, which are transmitted by mosquitoes. They are the major pathogens of emerging infectious diseases which threaten human health in the world. Although the diseases caused by different flaviviruses vary, the clinical symptoms are similar to some extent. Fever, especially high fever, is the most common symptom after flavivirus infection. Studies have demonstrated that caspase-1-dependent inflammatory response occurs in the infections with Zika virus and Japanese encephalitis virus, and this process is partially consistent with the mechanism of pyroptosis. Pyroptosis is a type of programmed death of inflammatory cells dependent on caspases, characterized by gasdermin-mediated pore formation, cell swelling, rupture, and release of inflammatory cytokines. In this paper, the flavivirus-caused macrophage pyroptosis in innate immunity was reviewed. The molecular mechanism of pyroptosis and the important components involved in pyroptosis were summarized, and the relationship between pyroptosis and representative flaviviruses was analyzed. This study will provide reference for the follow-up research on the role of pyroptosis in the pathogenesis of flaviviruses and shed light on the antiviral treatment.

Keywords: flavivirus; virus infection; pyroptosis; caspase; gasdermin D

伴随着人类的生老病死, 人体内的细胞也在不断进行着更替, 实现细胞自我更新以及清除病变细胞的主要途径是程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。PCD 包括细胞凋亡(apoptosis), 坏死性凋亡(necrotosis), 自噬(autophagy)和细胞焦亡等。细胞凋亡的特征在于细胞核中 DNA 浓缩, 形成凋亡小体, 形态学上保持膜的完整性, 不发生炎症反应。与细胞凋亡不同, 经典的细胞焦亡是由 caspase1 介导的炎性细胞程序性死亡, caspase1 切割焦孔素 D (gasderminD, GSDMD), 经切割后释放的 GSDMD-N 端在细胞膜上发生聚合, 形成小孔, 释放炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 造成局部炎症。探究病毒感染后引起细胞炎性程序性死亡

的激活机制, 有助于深入了解病毒感染后引起的严重炎症反应, 为病毒感染提供新的治疗策略和潜在的药物治疗靶点。

1 细胞焦亡

1.1 细胞焦亡的发现

PCD 是细胞生理和病理过程中的重要环节。Kerr 等在 1972 年首次提出凋亡的概念, 以描述胚胎发育过程中的细胞死亡, 以及正常成熟细胞的自我更新现象^[1]。除了保持机体内细胞的平衡, 程序性细胞死亡也可作为防御机制保护机体^[2]。在免疫应答中, 细胞被病原体感染或有害物质损伤时, 可触发细胞凋亡^[3]。

凋亡曾被认为是与细胞程序性死亡等价的

概念,然而 2001 年, Brennan 等(图 1)在研究鼠沙门氏菌时发现了一种与细胞凋亡不同的促炎机制可以杀死吞噬细胞,并且这种细胞死亡形式与经化学诱导发生凋亡的细胞出现的核浓缩不同,鼠沙门氏菌感染后死亡的巨噬细胞核内出现 DNA 片段化,且抑制胱天蛋白酶 1 (caspase1)可以阻止受感染的吞噬细胞死亡,但该抑制剂不能阻止经诱导凋亡的巨噬细胞死亡,提示这种细胞死亡方式有 caspase1 依赖性^[4]。为了与传统凋亡相区分,这种新的细胞死亡方式被称为“pyroptosis”——细胞焦亡,焦亡是由病原体感染或内源性炎性物质释放导致的细胞炎性死亡的过程^[5-6]。“pyro”表示“火”,反映了这种死亡的炎症性质,“ptosis”表示“衰落”,代表细胞死亡^[6-7]。

1.2 细胞焦亡的分子机制

1.2.1 细胞焦亡的 caspase1 依赖性途径

细胞焦亡作为一种细胞程序性死亡形式,

在病原体感染中发挥了重要作用。病原微生物感染后激活人体内的固有免疫。非特异性免疫细胞如巨噬细胞、树突状细胞等细胞膜上或细胞质中的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)不仅能够识别病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),也能识别细胞损伤后释放的内源性物质,又称损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs)^[8-9]。PAMPs 和 DAMPs 可进一步激活炎症小体(inflammasome)。炎症小体是由胞浆内 PRRs 参与组装的多蛋白复合物,其能够识别 PAMPs 和内源性的 DAMPs,进而激活 caspase1^[10]。caspase1 能够切割 GSDMD,切割后的 GSDMD-N 端具有打孔特性,能够与细胞膜上的脂质结合发生寡聚形成小孔,改变细胞膜内外端离子浓度梯度,使细胞膜肿胀破裂。激活的 caspase1 将无活性的 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 切割为成熟的 IL-1 β

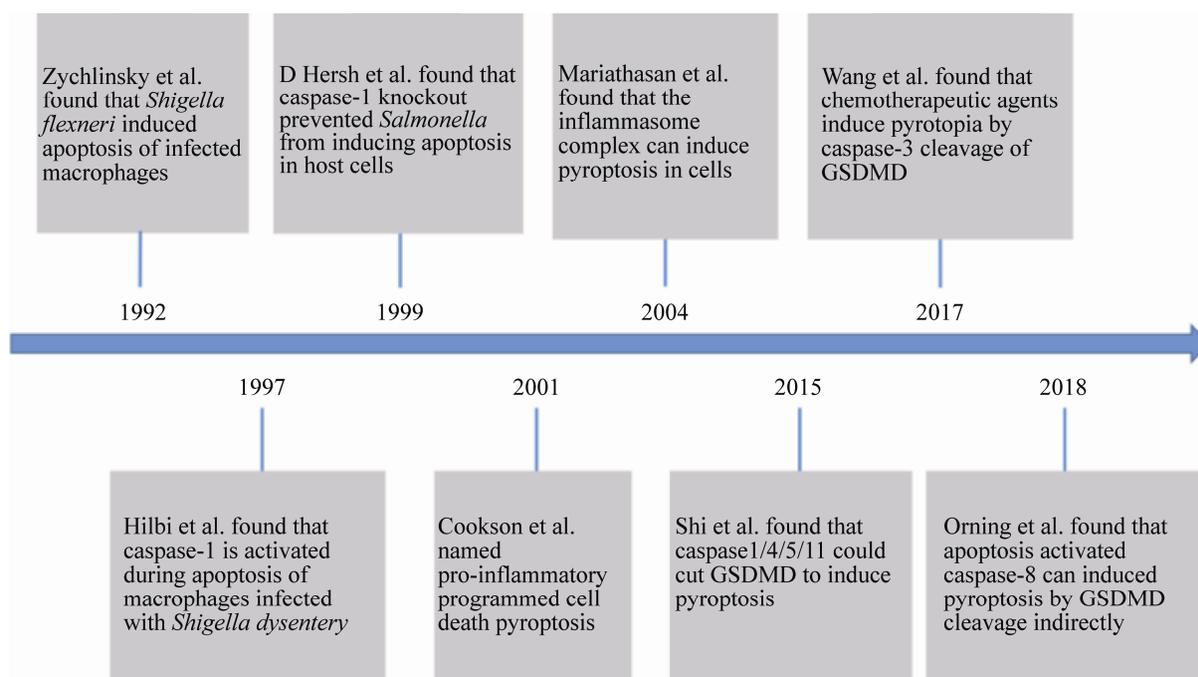


图 1 细胞焦亡的发展历史^[7]

Figure 1 The development history of cell pyroptosis^[7].

和 IL-18^[11]。IL-1 β 和 IL-18 经细胞膜上的小孔逸出, 造成程序性细胞炎性死亡。

1.2.2 细胞焦亡的 caspase4/5/8/11 依赖性途径

除了 caspase1 介导的焦亡经典途径, 细菌脂多糖诱导的非经典途径也能够引起细胞焦亡。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌外膜的主要成分。Shi 等^[8]发现, 在细菌感染后, 细菌中的 LPS 可以激活鼠源的 caspase11 和人源的 caspase4/5 引发细胞死亡, 在小鼠实验中发现, caspase11 可直接结合 LPS 作用于 GSDMD, 切割其 N 端使其活化^[12], 从而导致细胞膜发生低聚, 造成 K⁺外流, 细胞膜破裂, 炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 释放, 使细胞发生焦亡。由此可见 LPS 触发的细胞死亡在形态上与 caspase1 介导的细胞焦亡类似, 即都是由 gasdermin 家族介导的炎性细胞程序性死亡^[13]。

1.2.3 细胞焦亡的 caspase3 依赖性途径

长期以来, caspase3 被认为是诱导凋亡的相关分子。2016 年, 有研究发现化疗药物可刺激线粒体, 通过 DNA 损伤释放凋亡相关诱导因子, 启动内源性和外源性的凋亡通路, 激活 caspase3。同时, 焦孔素 E (gasdermine E, GSDME)的 N 端和 C 端之间有 caspase3 的切割位点, 活化的 caspase3 可以切割并释放 GSDME-N 端, GSDME-N 端具有成孔特性, 使细胞肿胀破裂, 发生焦亡^[8,14]。caspase3 可以将细胞凋亡和细胞焦亡联系起来, 而 caspase3/GSDME 信号通路作为一个“开关”, 当 GSDME 高表达时, caspase3 可以切割 GSDME 并引发细胞焦亡; 而当 GSDME 低表达时, 则会触发细胞凋亡^[15]。

1.3 炎症小体

2001 年 Martinon 等提出, 炎症小体在诱导细胞焦亡激活 caspase1, 切割炎性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 前体中发挥了重要作用^[16]。炎症

小体的 C 端是富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR), N 端是 caspase 激活募集结构域(caspase-activating and recruitment domain, CARD)或热休克蛋白结构域(pyrin domain, PYD), 两端中间的部分是核酸结合寡聚结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)。炎症小体的传感器包括 NLRP1、NLRP3 和 NLRC4 (属 NOD 样受体家族), AIM2 (absent in melanoma-2)或 Pyrin^[17-18]。不同的传感器可以特异性识别外源性的 PAMPs 和内源性的 DAMPs。炎症小体传感器通过 CARD 结构域募集激活 pro-caspase1, 炎症小体的 CARD 结构域与 pro-caspase1 前体结合并使其自身发生水解, 产生具有活性的成熟 caspase1, 活化的 caspase1 又将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 剪切为有活性的 IL-1 β 和 IL-18。有些炎症小体不含 CARD 结构域, 它们通过含 CARD 结构域的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated protein containing a CARD, ASC)结合 pro-caspase1, 继而使 IL-1 β 和 IL-18 活化。

1.4 caspase 家族

胱天蛋白酶家族中的 caspase1/3/4/5/8/11 参与并介导了炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 的活化, 诱导细胞发生焦亡。胱天蛋白酶是进化上保守的半胱氨酸依赖性内切蛋白酶家族(图 2)。胱天蛋白酶家族在结构上相似, 除 caspase8 和 caspase10 外, 其余都是由 3 个结构域组成的单链酶, 包含 N 端前肽, p20 亚基和 p10 亚基^[19]。caspase1/2/4/5/9/11 的启动胱天蛋白酶氨基末端包含胱天蛋白酶募集结构域(CARD), 而 caspase8/10 的胱天蛋白酶氨基末端包含死亡效应域(DED), 以促进在多蛋白复合物中的募集和激活^[20]。胱天蛋白酶以酶原形式存在于细胞内, 经切割 p20 和 p10 亚基后活化^[21]。11 种人胱天蛋白酶根据所激发细胞程序性死亡的不同

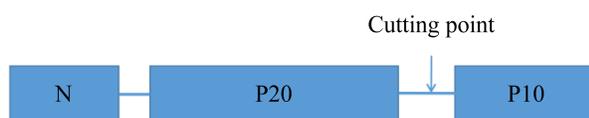


图2 caspase 家族结构示意图

Figure 2 The structure of caspase family.

分为两类：一类介导凋亡，另一类介导炎症反应^[22]。caspase2/3/6/7/8/9/10 可促进细胞凋亡，其中 caspase2/8/9/10 参与凋亡的启动，而 caspase3/6/7 参与细胞凋亡的执行。caspase1/4/5/11/12/13 介导炎症反应，在先天性免疫应答期间，将 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 剪切为有活性的 IL-1 β 和 IL-18^[23]。

1.5 GSDMD

除上述的炎症小体和 caspase 家族外，GSDMD 也是炎症细胞死亡中不可缺少的因子^[8]。炎症小体激活的 caspase1 和 LPS 激活的 caspase4/5/11 可以裂解 GSDMD。但 caspase 如何识别 GSDMD，及其与 caspase 激活的联系尚不清楚^[21-22,24]。GSDMD 又称 GSDMDC1 或 DFNA5L，是由 242 个氨基酸组成的蛋白，主要表达于免疫细胞和小肠黏膜上皮细胞表面，gasdermin 家族包括 GSDMA，GSDMB，GSDMC，GSDMD，GSDME 和 DFNB59^[25]。gasdermin 家族除 DFNB59 外都含有相似的 2 个结构域，其 N 端结构域可以诱导细胞发生焦亡。2015 年，Shi 等发现^[26]，当革兰阴性菌脂多糖或炎症小体激活 caspase1/4/5/11 时，这些胱天蛋白酶将 GSDMD 裂解为两部分，C 端 p20 和 N 端 p30。GSDMD 的 N 端结构域结合磷脂并多聚化，插入到细胞膜或线粒体膜上形成孔，导致细胞破裂以及炎症因子释放，引发细胞焦亡。Aglietti 等的实验结果也表明^[12]，GSDMD p30 与细胞膜中的脂质体共定位，提示被切割后的 p30 可能与细胞膜结合。并且研究人员在

电子显微镜下对脂质体上的 GSDMD p30 片段进行了可视化观察，观察结果表明，被 caspase11 切割释放的 GSDMD p30 可以在细胞膜上形成孔，并测量出所成孔平均内径约为 13 nm，因此推测这些孔的形成会破坏离子浓度梯度并造成水流入，使细胞肿胀并最终破裂，同时释放细胞因子。Liu 等揭示了 GSDMD 蛋白的 N 端结构域的自抑制状态^[27]，GSDMD N 端结构域的 1-2 loop 上的芳香族氨基酸可结合到位于 C 端结构域表面的一个疏水性口袋中。将携带 C 端结构域疏水性口袋突变的全长 GSDMD 转化到细胞中表达会诱导细胞死亡，而转化全长野生型 GSDMD 则不会导致细胞死亡。同时纯化的全长突变体蛋白也会在人工制备的脂质体上打孔，导致脂质体泄露。由于 GSDMD N 端负责结合磷脂和插入膜内，在 GSDMD N 端结构域表面被 C 端结构域结合覆盖的带正电和疏水性的氨基酸突变后，突变体可削弱或完全消除诱导细胞焦亡。研究人员之后构建了 GSDMD N 端膜孔模型，并突变多个位于多聚化界面上的氨基酸，这些突变体被证实能够减弱或消除 N 端结构域的聚合，同时也减弱了诱导细胞焦亡的能力。并且，参与 GSDMD 自抑制状态，磷脂结合和多聚化的蛋白界面有很大重叠，参与这些界面的氨基酸残基大多位于 1, 3 螺旋和 b1-b2 loop 周围，提示 GSDMD 演化出这些结构上叠合的蛋白界面来有效交叉调控自抑制或激活状态。GSDMD 结合磷脂和形成多聚化的能力对其诱导细胞焦亡至关重要，以上结果为进一步研究 GSDMD 和 caspase 结合的分子机制，以及筛选 GSDMD 靶向性分子抑制剂提供了重要的结构基础。

1.6 GSDMD 抑制剂

近年来有文献报道^[28]，在寨卡病毒感染后通过抑制细胞焦亡，可明显减轻病毒感染造

成的炎症反应和病理损害,甚至可减轻神经系统疾病的症状。Rathkey 等^[29]的一项研究发现, necrosulfonamide (NSA)可以作为 GSDMD 抑制剂发挥作用。NSA 是一种混合谱系激酶样蛋白 (MLKL)抑制剂,可有效防止细胞坏死。实验结果表明, NSA 可以直接与 GSDMD 结合,并抑制 GSDMD N 端寡聚化,从而阻止人/小鼠单核-巨噬细胞发生焦亡和 IL-1 β 释放。此外, dimethyl fumarate (DMF)也被证明具有 GSDMD 抑制剂作用。Humphries 等^[30]研究人员发现,递送至细胞的 DMF 或内源性 DMF 在半胱氨酸残基处与 GSDMD 反应形成 S-(2-琥珀酸)-半胱氨酸。GSDMD 琥珀化可防止其与半胱天冬酶相互作用,从而限制其加工、寡聚化和诱导细胞焦亡的能力。除上述 2 种药物外, Hu 等^[31]的一项研究认为, 双硫仑(disulfiram)可抑制 GSDMD 孔形成,但该药物不抑制其他 gasdermin 家族成员。而且在 GSDMD 孔形成后再加入双硫仑不会破坏已形成的孔。其实验结果表明, 双硫仑可以抑制 THP-1 和骨髓来源单核巨噬细胞中 IL-1 β 的释放,且抑制效果与泛半胱天冬酶抑制剂 Z-VAD-fmk 相当。这些 GSDMD 抑制剂通过直接结合 GSDMD,或将 GSDMD 琥珀化,又或阻止 GSDMD 孔形成来减轻由于病毒感染引起细胞焦亡造成的炎症反应,为慢性炎症的治疗提供了更多选择。

2 黄病毒感染与细胞焦亡

2.1 黄病毒简介

黄病毒(flavivirus)是一类具有包膜的单股正链 RNA 病毒。包括黄热病毒(yellow fever virus, YFV)、登革病毒(dengue virus, DENV)、日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)、西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)

和寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)等,是新发突发传染性疾病的重要病原体,严重威胁着全球,尤其是热带和亚热带地区的人类健康。

黄病毒主要通过蚊虫叮咬传播。该类病毒在蚊虫、白蛉等节肢动物体内增殖后,通过虫媒叮咬将病毒传染给人类或其他脊椎动物^[32]。病毒进入人体后,通常先在局部组织的树突状细胞、单核巨噬细胞内增殖,然后扩散至全身,依病毒嗜性不同而感染不同的靶细胞,引起相应的临床症状。

虽然不同黄病毒引起不同的临床疾病,但是它们的临床症状却有一些相似之处。首先是发热,发热是黄病毒感染后最常见的症状,而且往往表现为高热。此外,黄病毒感染还常伴有皮疹、关节痛等症状。除了全身症状之外,神经系统症状也是黄病毒感染常见的临床表现,JEV、WNV、TBEV 及 ZIKV 等病毒对人类健康最大的威胁都在于所引起的神经组织病变。但黄病毒的致病机制目前尚未完全阐明,仍待进一步研究。

2.1.1 寨卡病毒与细胞焦亡

ZIKV 感染轻可引起皮疹、关节痛、结膜炎、自限性发热性疾病,严重时还可引起神经系统并发症如先天性小头畸形和吉兰巴雷综合征(Guillain-Barré syndrom),因此在最近几年受到较多关注,它所诱导的神经前体细胞的死亡机制正是研究重点之一。

最初的研究显示, ZIKV 感染可诱导神经前体细胞发生凋亡^[33],但 He 等的研究显示, ZIKV 感染也会引起神经祖细胞发生焦亡,且实验表明使用 caspase1 抑制剂(VX-765)或敲除 caspase1 可减少 ZIKV 诱导的炎症反应和焦亡。并能显著减轻神经病变和脑萎缩^[28]。同一实验室的另一研究表明 ZIKV 感染 IFNAR1^{-/-}小鼠 5 d 后,脑组织和血清中都观察到 IL-1 β 水平增

加,此外研究人员使用 PMA 分化的人类 THP-1 巨噬细胞进行体外试验,并用脂多糖(LPS)/ATP 刺激作为阳性对照。结果表明 ZIKV 体外感染也能诱导 IL-1 β 产生。此外,实验使用 caspase1 抑制剂(AC-YVAD-CHO)和 NLRP3 抑制剂格列本脉,结果表明抑制剂能显著降低 ZIKV 诱导的 IL-1 β 产生。同时,通过 siRNA 沉默 ZIKV 感染前细胞中 NLRP3、ASC 和 caspase1 的表达也验证了上述结果。这一系列实验结果表明,ZIKV 感染能够激活 NLRP3 炎症小体,导致 caspase1 的裂解和 IL-1 β 的释放。但 caspase1 不仅能抑制病毒复制,在一定条件下也会促进病毒感染。在 He 等^[34]一项新的研究中表明,ZIKV 感染后,NS1 蛋白募集宿主去泛素酶 USP8 在 Lys134 处从 caspase1 上切割下 K11 连接的多泛素链,从而稳定 caspase1 并增强炎症小体激活。活化的 caspase1 促进了 cGAS 的裂解,由于 cGAS 介导的 I 型 IFN 信号是宿主抗病毒免疫的重要组成部分,cGAS 裂解后,I 型 IFN 产生减弱,ZIKV 以此逃避宿主抗病毒反应,促进病毒感染。

2.1.2 登革病毒与细胞焦亡

登革病毒(dengue virus, DENV)有 4 种血清型(DENV1-4),主要分布在热带和亚热带地区。DENV 感染可导致登革热(dengue fever, DF),少数情况下也可引起更严重的登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)和登革热休克综合征(dengue shock syndrome, DSS),表现为出血和毛细血管渗透性增高等症状。后 2 种疾病通常发生在曾经感染过一种血清型 DENV 的患者再次感染另一种血清型 DENV 之后,抗体依赖的感染增强作用(antibody-dependent enhancement, ADE)或者炎症风暴是可能的机制^[35]。有研究表明,巨噬细胞是 DENV 感染的重要靶细胞,也是促炎性细胞因子的重要来

源^[36]。DENV 感染引起细胞因子大量释放,发病早期 2–5 d IFN- γ 和 IL-8 的平均水平比发病晚期 6–15 d 高^[37–40],且 IFN α 水平与登革热病毒血症水平呈正相关。然而这些炎症因子是通过何种机制产生和释放,目前仍不清楚。

Suwanmanee 等^[41]的研究发现,DENV 感染后可引起两种类型的细胞死亡,即细胞凋亡和细胞焦亡。Torrentes-Carvalho 等^[42]的研究认为,登革病毒感染的单核细胞中 CD14-TLR-2 受体可识别病毒,并能激活 NF- κ B,将其移位到细胞核内,促进肿瘤坏死因子(TNF- α)的表达,TNF- α 与其跨膜受体 TNFR 结合,并相继激活 caspase8 和 caspase3,诱导细胞凋亡。Wu 等^[43]的实验通过将登革病毒与炎性和静止状态的巨噬细胞共孵育,然后进行噬斑检测,发现炎性巨噬细胞产生更高水平的 IL-18 和 IL-1 β ,并且在炎性巨噬细胞中发现 pro-IL-18、pro-IL-1 β 以及 NLRP3 转录上调,caspase1 活性增加。同时,体外感染 48 h 后,登革病毒感染的炎性巨噬细胞台盼蓝染色阳性,并观察到 LDH 释放增加和 DNA 断裂。另外,胱天蛋白酶抑制剂 Z-YVAD-FMK 能够抑制 IL-18 和 IL-1 β 的分泌和 LDH 的释放,但 caspase3 抑制剂在相同条件下没有作用。该实验结果表明,登革病毒感染的炎性巨噬细胞激活 caspase1 以分泌 IL-18 和 IL-1 β ,诱导细胞凋亡^[43]。显然,巨噬细胞感染 DENV 后可以发生凋亡,也可以发生焦亡,亦或也可发生其他形式的程序性细胞释放,什么因素调节着这些程序性细胞死亡?它们对登革热发病机制,特别是 DHF 和 DSS 发病机制有何影响,这些问题都有待将来继续研究。

2.1.3 日本脑炎病毒与细胞焦亡

日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)可引起日本脑炎,又称乙型脑炎,主要流行于东亚地区亚热带环境,是威胁儿童健康的

重要病原体。尽管目前对于 JEV 感染引起神经中枢系统炎症的机制尚不清楚,但我们最近的一项研究表明^[44],在注射相同剂量 JEV 的情况下,对比 $Axl^{-/-}$ 小鼠和 $Axl^{+/+}$ 小鼠血清中的细胞因子水平,发现与 $Axl^{+/+}$ 小鼠相比, $Axl^{-/-}$ 小鼠血清中的 IL-6 和 IL-1 α 显著增加, (Axl 是一种受体酪氨酸激酶,在黄病毒感染中起多种作用)且通过比较大脑、血清和腹腔灌洗液中 IL-1 α 的含量,发现血清中的 IL-1 α 主要来自腹腔。随后通过体外培养 JEV 感染小鼠的腹腔巨噬细胞,且体外低渗诱导巨噬细胞死亡,发现感染后 24 h 的 $Axl^{-/-}$ 巨噬细胞 IL-1 α 表达量比对照组巨噬细胞明显升高,且 $Axl^{-/-}$ 的巨噬细胞比对照组更易死亡,死亡的同时释放大量 IL-1 α 。为探究 JEV 感染巨噬细胞的死亡模式,利用转录组测序对 JEV 感染 24 h 后腹腔巨噬细胞进行检测,结果表明,在 $Axl^{-/-}$ 小鼠 JEV 感染后的巨噬细胞中可观察到 caspase1 和 GSDMD 的转录显著增强,且 IL-1 β 的转录也有所上调。并且,间接免疫荧光染色的结果显示,JEV 感染的巨噬细胞与焦亡标记物 GSDMD-N 和凋亡标记物 TUNEL 有明显共染,而与坏死标记物 RIPK1 没有共染,这提示 JEV 感染的腹腔巨噬细胞主要通过凋亡和焦亡的形式死亡。此外,通过 Western blotting 也检测出 JEV 感染的腹腔巨噬细胞中 cleaved-caspase1 和 GSDMD 的表达,进一步验证了巨噬细胞焦亡的发生。此外, Kaushik 等的研究^[45]通过静脉注射使 BALB/c 小鼠感染 5×10^5 PFU 的 JEV,然后通过 qRT-PCR 方法检测 3 dpi、5 dpi 和 7 dpi 的脑组织中 IL-18 和 IL-1 β 的 mRNA 含量。结果表明,与未感染小鼠相比,感染小鼠脑组织中的 IL-1 β 和 IL-18 mRNA 含量在所有时间点均有显著增加。同时,实验通过 ELISA 方法检测 JEV 感染小鼠脑内

IL-1 β 和 IL-18 的含量,观察结果与 qRT-PCR 结果一致。随后,通过在体外以 5 MOI 值的 JEV 感染 BV-2 小鼠胶质细胞系,以 LPS+ATP 作为阳性对照,测量了感染 3 h 后 BV-2 细胞中的 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 水平,结果表明 IL-1 β mRNA 比阴性对照增加了 5 倍,IL-18 mRNA 增加了 2.5 倍,同时在蛋白水平上通过 ELISA 检测自 BV-2 细胞中分离的总蛋白,相较阴性对照,IL-1 β 和 IL-18 水平显著上调。此外,通过 caspase1 活性测定法观察到感染 JEV 后小鼠 3 dpi 脑内活化 caspase1 含量增加了 2 倍,此后 5 dpi 和 7 dpi 活性 caspase1 水平降低。同时,在使用了 caspase1 抑制剂(YVAD)后,IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低,并且,经过 NLRP3 敲低处理的 JEV 感染组与单纯 JEV 感染组相比,IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低。上述实验结果也印证了 caspase1 和 NLRP3 是 JEV 感染产生 IL-1 β 和 IL-18 的重要中介物质。那么,这一结果提示我们 JEV 引起的感染可能导致由 NLRP3 炎性小体介导的且 caspase1 依赖性的炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 释放,这与我们已知的细胞焦亡机制十分相似,但仍需进一步研究和了解。

2.2 其他黄病毒感染与细胞焦亡

除上述提到的寨卡病毒、登革病毒、日本脑炎病毒之外,西尼罗河病毒和蜱传脑炎病毒也是重要的黄病毒。这 2 种病毒通常引起的症状较轻,但也可引发严重的神经系统疾病^[46-47]。WNV 是一种由蚊子传播的嗜神经性黄病毒,在全球范围内广泛出现,可导致人类、鸟类和马的西尼罗脑炎^[48]。WNV 可在多种类型细胞中复制, Kumar 等^[49]的研究表明 WNV 感染(MOI=0.1) 48 h 后可诱导小鼠骨髓源性树突状细胞(BMDC)中 IL-1 β 和 caspase1 的 mRNA 表达,并且,这种诱导在 WT 和 $ASC^{-/-}$ (ASC 是炎症小体复合物

的关键衔接蛋白)小鼠之间具有差异,实验结果显示,WNV感染后,野生型小鼠BMDC中IL-1 β 的裂解形式增加,但在ASC^{-/-}小鼠中却显著降低,同时野生型小鼠在感染48h和72h时,caspase1的P20亚基显著增加,但ASC^{-/-}小鼠中却显著降低,这种降低与IL-1 β 水平降低相关。但是,野生型和ASC^{-/-}小鼠BMDC之间的caspase1 mRNA的倍数增加没有差异,这表明ASC的缺乏影响caspase1的激活但不影响基因的转录。以上实验结果共同表明,WNV诱导炎症小体的组装,且caspase1激活需要炎症小体。此外,Del Carmen Parquet等^[50]的实验指出WNV感染的单核细胞中存在细胞凋亡。实验在不同时间收获病毒感染细胞和对照细胞,分离细胞DNA,在2%琼脂糖凝胶上电泳,在感染72h的电泳条带上出现DNA阶梯以180–200 bp的大小递增,但在对照组电泳条带上未出现该DNA阶梯。同时,实验人员对受感染细胞核进行hoechst染色,观察到在24h,WNV感染的单核细胞13%的细胞核呈不规则形状,72h时上升至87%。此外WNV感染细胞中膜联蛋白V实验阳性细胞数量显著增加,WNV感染细胞在24h和72h阳性率为10%和68%,而对照细胞则为2%和3%。上述实验结果表明在WNV感染中细胞凋亡也发挥着重要作用。因此,在WNV感染过程中既出现细胞焦亡也出现细胞凋亡,二者之间是否存在联系,仍需要进一步探索。

3 黄病毒感染引起细胞焦亡的机制

在黄病毒感染后产生免疫应答的过程中,固有免疫发挥着举足轻重的作用。以登革病毒为例,人类在被携带登革病毒的蚊子叮咬后,病毒由蚊子的唾液进入皮肤。而后利用宿主质膜

与病毒包膜蛋白之间配体-受体相互作用进入宿主细胞,在酸性条件下,宿主细胞将配体-受体复合物内吞入胞,形成细胞内小体,随后病毒脱膜蛋白形成核衣壳。在pH 7.2条件下,病毒核衣壳在内质网进行翻译、组装,接着在高尔基体内发生成熟和修饰。随后病毒颗粒释放,感染其他细胞。由于皮肤中存在复杂的免疫网络,在病毒进入机体后,固有免疫细胞在感染早期立即响应,一方面,巨噬细胞、树突状细胞等通过细胞膜上的PRRs识别PAMPs和DAMPs对病毒感染的宿主细胞和释放的内源性物质进行吞噬,且PAMPs和DAMPs可进一步激活炎症小体,诱导细胞程序性死亡,从而清除病毒以及受感染的宿主细胞,维持机体的稳态。另一方面,巨噬细胞经抗原刺激活化后,分泌趋化因子和炎症细胞因子至感染部位发挥炎症杀伤作用。在先前的研究中发现^[8–9,43],登革病毒感染后可启动2种细胞程序性死亡形式,细胞凋亡和细胞焦亡。诱发细胞焦亡的机制(图3)是由于登革病毒可以结合并激活脾酪氨酸激酶(Syk)偶联的C型凝集素(CLEC5A),C型凝集素广泛表达于各类免疫细胞,CLEC5A诱导跨膜受体DAI2进行磷酸化使Syk活化,损伤宿主细胞的DNA,同时激活caspase1,活化后的caspase1诱导GSDMD的切割并激活NLRP3炎症小体,炎症小体将pro-IL-1 β 和pro-IL-18剪切为有活性的IL-1 β 和IL-18,切割后的GSDMD释放GSDM-N端与细胞膜上脂质体结合,使细胞质膜发生低聚并诱导质膜上孔形成,产生离子梯度使水流入细胞,导致细胞的裂解。炎症细胞因子IL-1 β 和IL-18由细胞膜上的孔流出,引起局部炎症反应,造成细胞焦亡^[41,51]。

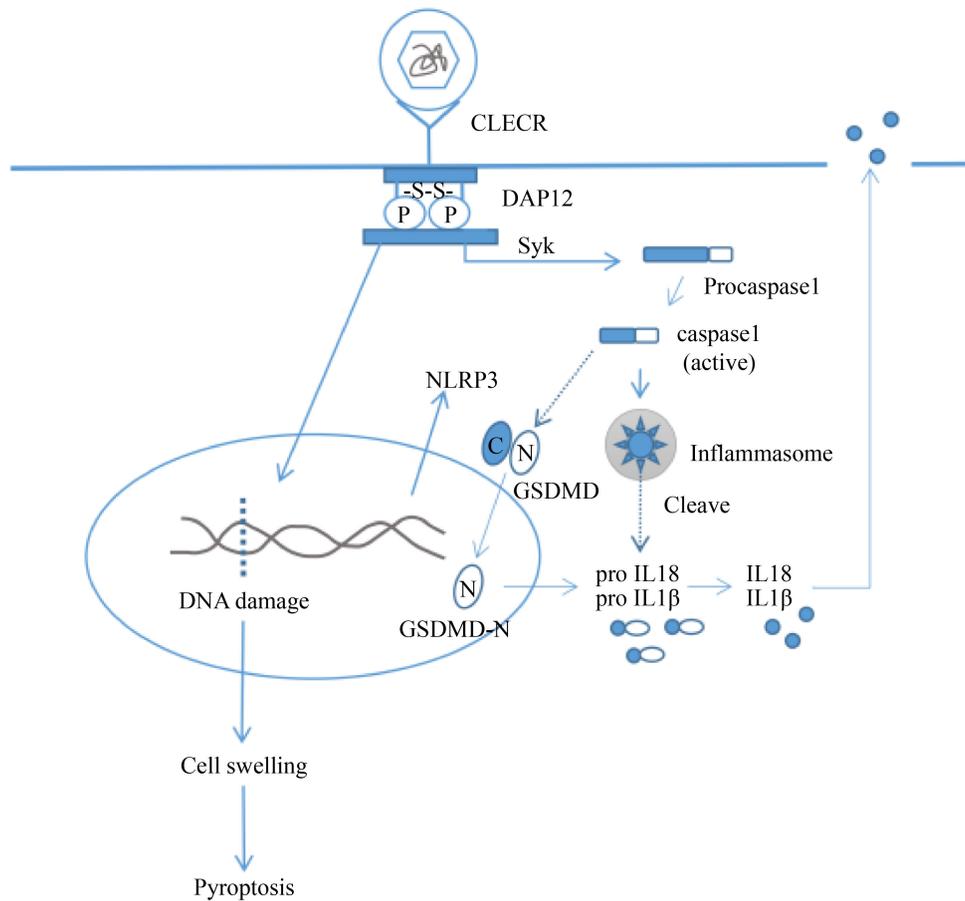


图 3 登革病毒感染引起细胞焦亡机制示意图

Figure 3 The mechanism of cell pyroptosis caused by dengue virus infection.

4 总结与展望

细胞焦亡是一种依赖于胱天蛋白酶 1 的炎症细胞程序性死亡形式，与传统的细胞程序性死亡形式—细胞凋亡不同，焦亡的特点在于孔形成、细胞肿胀、质膜破裂以及细胞炎性内容物的释放。通过观察和总结科研人员的实验结果，我们发现，在黄病毒感染过程中，细胞焦亡并不是个例，而是在 ZIKV、JEV、DENV 等主要黄病毒感染后出现的普遍现象。但细胞焦亡往往具有两面性，一面在病毒感染性疾病尤其是黄病毒感染过程中，巨噬细胞焦亡可以消除病毒在细胞中的复制位点，介导炎症反应进

行免疫防御。同时，其释放的炎症因子在一定程度上可以清除病毒感染的细胞，但另一面，如果炎症因子释放数量过多，可能会引发细胞因子风暴，反而造成持续的炎症反应以及感染后的高热症状。正因如此，靶向作用于 GSDMD 或 caspase1 的抑制剂也源源不断地被筛选出来，以解决由于细胞焦亡造成的慢性炎症损伤。但有时，细胞焦亡不一定抑制病毒感染，在一定条件下，caspase1 也有可能促进病毒感染。有研究表明，ZIKV 的非结构蛋白 NS1 可以募集宿主去泛素酶 USP8，从而稳定活化的 caspase1，活化的 caspase1 从而促进 cGAS 的裂解，导致 I 型 IFN 产生减弱，从而延长病毒的

复制。在病毒感染与细胞焦亡相互作用的研究中,我们仍有路要走,因此,研究黄病毒感染导致细胞焦亡的详细机制有助于更好地了解病毒与宿主细胞之间的相互作用,可为抗病毒感染治疗提供新的思路,为抗病毒药物的研发提供新的靶点。

在研究过程中,仍有许多问题等待解答,如 caspase1 是如何被炎症小体激活的? GSDMD 与 caspase1 之间又如何相互作用? 有研究表明 DENV 感染后使用 caspase1 抑制剂仅能减少一部分 IL-1 β 的释放,黄病毒感染是否还存在其他引起 IL-1 β 释放的机制? 细胞焦亡是否仅存在于黄病毒感染,在其他病毒感染过程中是否也有焦亡的发生? 这些问题值得我们进一步的思考与研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4): 495–516.
- [3] Zhou XC, Jiang WB, Liu ZS, Liu S, Liang XZ. Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. *Viruses*, 2017, 9(11): E316.
- [4] Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(1): 31–40.
- [5] Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(7): 407–420.
- [6] Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews*, 2015, 265(1): 130–142.
- [7] Ruan JW, Wang SJ, Wang JB. Mechanism and regulation of pyroptosis-mediated in cancer cell death. *Chemico-Biological Interactions*, 2020, 323: 109052.
- [8] Shi JJ, Zhao Y, Wang YP, Gao WQ, Ding JJ, Li P, Hu LY, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014, 514(7521): 187–192.
- [9] Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlari T, Hornung V. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(5): 765–783.
- [10] Chen IY, Ichinohe T. Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(1): 55–63.
- [11] Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological Reviews*, 2011, 243(1): 136–151.
- [12] 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 Sciences of the United States of America*, 2016, 113(28): 7858–7863.
- [13] Gong WH, Shi Y, Ren JJ. Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases. *Immunobiology*, 2020, 225(2): 151884.
- [14] 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.
- [15] Jiang MX, Qi L, Li LS, Li YJ. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discovery*, 2020, 6: 112.
- [16] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-B. *Molecular Cell*, 2002, 10(2): 417–426.
- [17] 王巍, 谢正德. 病毒感染激活和抑制炎症小体的研究进展. *病毒学报*, 2019, 35(3): 557–564.
Wang W, Xie ZD. Research progress in activation and inhibition of inflammasome by viral infection. *Chinese Journal of Virology*, 2019, 35(3): 557–564. (in Chinese)
- [18] 王巍, 段亚丽, 张萌, 陈祥鹏, 许黎黎, 朱云, 谢正德. 人腺病毒 7 型感染激活 NLRP3 炎症小体的机制研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2020, 34(2): 113–121.
Wang W, Duan YL, Zhang M, Chen XP, Xu LL, Zhu Y, Xie ZD. Mechanism of NLRP3 activation by human adenovirus 7 infection. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2020, 34(2): 113–121. (in Chinese)
- [19] Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological*

- Reviews*, 2003, 193: 10–21.
- [20] Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 2005, 73(4): 1907–1916.
- [21] Wang K, Sun Q, Zhong X, Zeng MX, Zeng H, Shi XY, Li ZL, Wang YP, Zhao Q, Shao F, Ding JJ. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis. *Cell*, 2020, 180(5): 941–955.e20.
- [22] Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(4): 4807–4818.
- [23] Zeng ZL, Li GH, Wu SY, Wang Z. Role of pyroptosis in cardiovascular disease. *Cell Proliferation*, 2019, 52(2): e12563.
- [24] Clark AC. Caspase allostery and conformational selection. *Chemical Reviews*, 2016, 116(11): 6666–6706.
- [25] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20(3): 143–157.
- [26] 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.
- [27] Liu ZH, Wang CP, Yang J, Zhou BW, Yang R, Ramachandran R, Abbott DW, Xiao TS. Crystal structures of the full-length murine and human gasdermin D reveal mechanisms of autoinhibition, lipid binding, and oligomerization. *Immunity*, 2019, 51(1): 43–49.e4.
- [28] He ZJ, An S, Chen JH, Zhang SQ, Tan CH, Yu JC, Ye HM, Wu Y, Yuan J, Wu JH, Zhu X, Li MF. Neural progenitor cell pyroptosis contributes to zika virus-induced brain atrophy and represents a therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(38): 23869–23878.
- [29] Rathkey JK, Zhao JJ, Liu ZH, Chen YH, Yang J, Kondolf HC, Benson BL, Chirieleison SM, Huang AY, Dubyak GR, Xiao TS, Li XX, Abbott DW. Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis. *Science Immunology*, 2018, 3(26): eaat2738.
- [30] Humphries F, Shmuel-Galia L, Ketelut-Carneiro N, Li S, Wang BW, Nemmara VV, Wilson R, Jiang ZZ, Khalighinejad F, Muneeruddin K, Shaffer SA, Dutta R, Ionete C, Pesiridis S, Yang S, Thompson PR, Fitzgerald KA. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science*, 2020, 369(6511): 1633–1637.
- [31] Hu JJ, Liu X, Xia SY, Zhang ZB, Zhang Y, Zhao JX, Ruan JB, Luo XM, Lou XW, Bai Y, Wang JH, Hollingsworth LR, Magupalli VG, Zhao L, Luo HR, Kim J, Lieberman J, Wu H. FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation. *Nature Immunology*, 2020, 21(7): 736–745.
- [32] Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host & Microbe*, 2009, 5(4): 318–328.
- [33] Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, Avšič Županc T. Zika virus associated with microcephaly. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 374(10): 951–958.
- [34] He ZJ, Chen JH, Zhu X, An S, Dong XH, Yu JC, Zhang SH, Wu Y, Li G, Zhang YY, Wu JH, Li MF. NLRP3 inflammasome activation mediates zika virus-associated inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, 217(12): 1942–1951.
- [35] Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2010, 338: 67–82.
- [36] Wu SJL, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, 2000, 6(7): 816–820.
- [37] Cheung KT, Sze DMY, Chan KH, Leung PHM. Involvement of caspase-4 in IL-1 beta production and pyroptosis in human macrophages during dengue virus infection. *Immunobiology*, 2018, 223(4/5): 356–364.
- [38] Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, Mokashi N, Vaidya D, Shah PS, Cecilia D. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS ONE*, 2010, 5(1): e8709.
- [39] Tang YB, Kou ZH, Zhang FC, Yao X, Liu SY, Ma JM, Zhou YS, Zhao W, Tang XP, Jin X. Both viremia and cytokine levels associate with the lack of severe disease in secondary dengue 1 infection among adult Chinese patients. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15631.

- [40] Davis BK, Wen HT, Ting JPY. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual Review of Immunology*, 2011, 29: 707–735.
- [41] Suwanmanee S, Luplertlop N. Immunopathogenesis of dengue virus-induced redundant cell death: apoptosis and pyroptosis. *Viral Immunology*, 2017, 30(1): 13–19.
- [42] Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SRI, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, Kubelka CF. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, 104(8): 1091–1099.
- [43] Wu MF, Chen ST, Yang AH, Lin WW, Lin YL, Chen NJ, Tsai IS, Li L, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*, 2013, 121(1): 95–106.
- [44] Wang ZY, Zhen ZD, Fan DY, Qin CF, Han DS, Zhou HN, Wang PG, An J. Axl deficiency promotes the neuroinvasion of Japanese encephalitis virus by enhancing IL-1 alpha production from pyroptotic macrophages. *Journal of Virology*, 2020, 94(17).
- [45] Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, Basu A. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32270.
- [46] Lim SM, Van Den Ham HJ, Oduber M, Martina E, Zaaraoui-Boutahar F, Roose JM, Van IJcken WFJ, Osterhaus ADME, Andeweg AC, Koraka P, Martina BEE. Transcriptomic analyses reveal differential gene expression of immune and cell death pathways in the brains of mice infected with West Nile virus and chikungunya virus. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1556.
- [47] Cheeran MCJ, Hu SX, Sheng WS, Rashid A, Peterson PK, Lokensgard JR. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection. *Journal of NeuroVirology*, 2005, 11(6): 512–524.
- [48] Shrestha B, Gottlieb D, Diamond MS. Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. *Journal of Virology*, 2003, 77(24): 13203–13213.
- [49] Kumar M, Roe K, Orillo B, Muruve DA, Nerurkar VR, Gale M, Verma S. Inflammasome adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) is critical for the immune response and survival in West Nile virus encephalitis. *Journal of Virology*, 2013, 87(7): 3655–3667.
- [50] Del Carmen Parquet M, Kumatori A, Hasebe F, Morita K, Igarashi A. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Letters*, 2001, 500(1/2): 17–24.
- [51] Tan TY, Chu JJH. Dengue virus-infected human monocytes trigger late activation of caspase-1, which mediates pro-inflammatory IL-1 β secretion and pyroptosis. *The Journal of General Virology*, 2013, 94(Pt 10): 2215–2220.

(本文责编 李磊)