

程序性细胞死亡 Pyroptosis 最新研究进展

鞠小丽¹, 陈亮², 陈克平² 综述, 王强² 审校

摘要 Pyroptosis 是最近发现的一种依赖于半胱氨酸蛋白-1 (Caspase-1) 的程序性细胞死亡方式。这种死亡方式和细胞凋亡及其它程序性死亡在细胞学形态、分子机制上有着本质的区别。其主要特征为依赖于 Caspase-1 剪切激活和促炎症性细胞因子白介素 (IL)-1 β 和 IL-18 的释放。而 Caspase-1 的活化受到胞内蛋白复合物炎症体的调控。该炎症体由 NLRs 蛋白 (如 NLRP3 或 NLR4)、接头蛋白 ASC 以及 Caspase-1 构成。Pyroptosis 最初是在伤寒沙门氏菌感染小鼠巨噬细胞的模型中被发现, 随后研究显示 Pyroptosis 在细菌和病毒感染、自身免疫性疾病以及肿瘤发生中都起到关键性作用。对这种程序性死亡的深入研究将有助于对细菌感染防治和某些疾病的致病机制研究提供帮助, 并最终为临床应用提供新思路。

关键词 程序性细胞死亡; Pyroptosis; Caspase-1; 炎症体复合物

中图分类号 R 35

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0456-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.035

细胞死亡伴随着机体的整个生命过程, 正常组织在新陈代谢的生理过程和机体创伤过程中都会发生细胞死亡。按照死亡的方式不同, 细胞死亡分为程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 和非程序性死亡。过去的观点一直认为程序性死亡特指细胞凋亡。但随着分子生物学的不断发展, 最近人们发现其它类型的程序性死亡如坏死性凋亡 (Necroptosis) 和炎症性细胞死亡 (Pyroptosis)。现对细胞发生 Pyroptosis 的形态学特征、生化变化、发生的分子机制以及在疾病中的作用进行阐述。

1 Pyroptosis 的发现和命名

Pyroptosis 是 1992 年 Zychlinsky et al^[1] 在鼠巨噬细胞被伤寒沙门氏菌感染后发现的一种死亡方式。研究发现这种细胞死亡方式与细胞凋亡具有某些相同的特征, 如 DNA 片段化、核浓缩及依赖于细胞凋亡蛋白酶 (Caspase), 因而最初命名这种死亡方式为凋亡 (Apoptosis)。随后显示这种死亡方式依赖于 Caspase-1, 进一步研究显示它和细胞凋亡有本质的区别。并于 2010 年正式命名为 “Pyroptosis”。“Pyro”意为火 (fire), 显示这种细胞死亡方式的炎症特征, “ptosis”意为下降 (failing), 和描述程序性死亡术语相匹配^[2]。Pyroptosis 通常是炎症性细胞死亡, 其通过激活由 Caspase-1 组成的炎症体诱导细胞释放促炎症细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)^[3]。

2 Pyroptosis 细胞形态学特征以及和凋亡、坏死的区别

Pyroptosis 在细胞形态上和细胞凋亡、Necroptosis 有着明显的区别 (表 1)。细胞凋亡通常伴随着细胞质浓缩、核固缩、DNA 片段化同时伴随着凋亡小体形成。而细胞坏死则伴随着细胞肿胀、细胞器肿大、细胞溶解破裂和溶酶体酶泄漏并常引起炎症反应。先前研究^[2-3]表明程序性死亡只包含细胞凋

表 1 Pyroptosis 与 Apoptosis 及 Necroptosis 的比较

	Pyroptosis	Apoptosis	Necroptosis
细胞形态学	细胞肿胀、细胞逐渐变大、细胞膜裂解	细胞质浓缩、细胞膜完整	细胞肿胀、细胞膜通透性增高、细胞膜裂解
核形态学	轻度核固缩	核固缩	轻度核固缩
DNA 片段化	轻度	显著	轻度
凋亡小体	无	有	无
炎症信号	炎症性	非炎症性	炎症性
释放的 DAMP	HMGB1、ATP、IL-1 β 和 IL-18	Ecto-CRT、HMGB1 和 ATP	长基因组 DNA 和 IL-6

2016-10-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81502621、81502088); 江苏省自然科学基金 (编号: BK20140539); 江苏大学高级人才科研启动基金项目 ((编号: 14JDC065、15JDC021); 中国博士后科学基金 (编号: 2015M571677)

作者单位: 江苏大学¹ 医学院病理教研室、² 生命科学研究院, 镇江 212013

作者简介: 鞠小丽, 女, 讲师, 博士;

王强, 男, 助理研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanqiang@ujs.edu.cn

亡,而随后的研究^[4-6]显示细胞程序性死亡还包括依赖于受体相互作用蛋白-1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 和受体相互作用蛋白-3 (receptor-interacting protein 3, RIP3) 激酶的程序性坏死 (Necroptosis) 和依赖于 Caspase-1 的程序性死亡 (Pyroptosis)。真核细胞诱发 Pyroptosis 的主要特点为细胞膜失去完整性并在细胞膜上快速形成 1~2 nm 孔径的孔; 随后释放细胞质内成分到细胞外环境并伴随着细胞核浓缩及细胞肿胀; 这些孔的形成促进炎症性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[4-6] (图 1)。和细胞凋亡时细胞核保持完整不同,随着 Pyroptosis 细胞肿胀、细胞逐渐变大、细胞核也逐渐变圆和浓缩^[7-8],随后 DNA 发生片段化,并能被 TUNEL 染色^[9-10],但是 DNA 片段化程度和染色的强度没有凋亡高。

Pyroptosis 细胞有几个明显特征归纳如下: 第一,该种死亡方式是由炎症性 Caspase-1 介导的,并且只需要 Caspase-1 的蛋白水解酶活性而不需要蛋白酶自我剪切活性。第二,炎症性 Caspase 激活导致在细胞膜上形成小孔,小分子染料如 PI 和 EtBr 可以进入细胞内并对核染色。随着细胞膜通透,各

种离子和水进入细胞内引起细胞肿胀和细胞裂解。第三,Pyroptosis 发生时 DNA 发生片段化并能被 TUNEL 染色。

3 Pyroptosis 被激活的分子机制

病原微生物含有某些共有的高度保守的分子结构,如脂多糖、寡肽糖和真菌的酵母多糖等统称为病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP)。不同的病原微生物进入细胞后这些共同的保守 PAMP 能分别被不同的病原识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 所识别。其中核苷酸结合寡聚化结构域样受体 (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors, NLRs) 主要识别细胞内病原体。在人类基因组中已显示 22 个 NLRs 蛋白。NLRs 蛋白含有共同的结构域,分别由核苷酸结合寡聚化区域、胱天蛋白酶招募结构域或热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD) 和富含亮氨酸的重复序列组成。目前研究比较多的有核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 1 和 3 (NLR family pyrin domain containing 1,3, NLRP1 和 NLRP3)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 4 (NLR family CARD

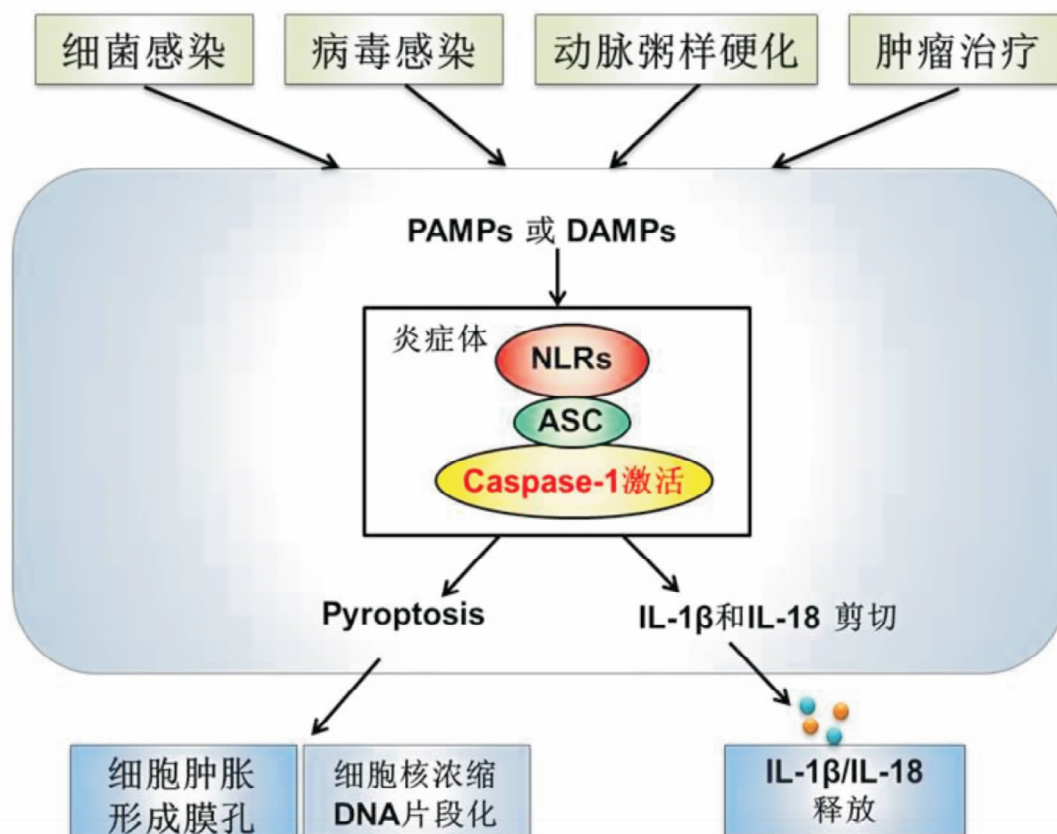


图 1 Pyroptosis 激活的分子机制

domain containing 4, NLRC4) 和核苷酸结合寡聚域样受体(nucleotide binding oligomerization domain containing 1, NOD1) 等 NLRs 蛋白。

3.1 炎症体的组成及激活机制 一部分病原微生物或者危险信号进入细胞后,通过保守的分子结构 PAMP 能够被 NLRs 蛋白所识别。NLRs 蛋白识别这些危险信号后,通过 NLRs 蛋白的 PYD 结构域和凋亡相关斑点样蛋白(apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC) 的 PYD 结构域通过 PYD-PYD 相互作用的方式锚定。接头蛋白 ASC 含有半胱天冬酶补充结构域(caspase recruitment domain, CARD) 和 PYD 结构。随后 ASC 通过 CARD-CARD 相互作用招募 Caspase-1 前体。这些蛋白最终形成一个大分子量的炎症体复合物。Caspase-1 利用其活性位点半胱氨酸残基通过自我剪切形成其活性形式就 P10/P20 二聚体。活化的 Caspase-1 的对 IL-1 β 前体(pro-IL-1 β) 和 IL-18 前体(pro-IL-18) 进行剪切,最终形成成熟的炎症性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18。这些炎症因子激活各种免疫细胞并到达感染部位对病原进行清除(图 1)。

3.2 Caspase-1 激活机制及功能 Caspases 在细胞凋亡和 Pyroptosis 中发挥了关键作用, Caspases 以无活性的前体存在于细胞质中并通过其它 Caspases 蛋白酶剪切来激活。Caspase-1 是最早被发现和鉴定的 Caspases,因其参与 pro-IL-1 β 的剪切最初命名为 IL-1 β 转化酶^[11],随后全长 cDNA 被克隆并命名为 IL-1 β 转化酶(IL-1 β converting enzyme, ICE)^[12]。44 ku 的 Caspase-1 由 10 ku 的 CARD 结构域(Caspase 的激活和招募结构域)、一个大亚基(p20) 和一个小亚基(p10) 组成。小鼠 Caspase-1 有 6 个剪切位点,剪切 D103 或 D122 位点能移除无活性前体的 CARD 结构域;而剪切 D296、D308、D313 和 D314 位点则能催化激活 p10 和 p20 结构域。激活的 Caspase-1 自我进行剪切释放 CARD 结构域和 p20、p10 并形成有活性的酶,依赖于 Caspase-1 激活是 Pyroptosis 死亡的最主要特征。虽然过表达 ICE 能诱导细胞凋亡,然而 Caspase-1 并不参与细胞凋亡,Caspase-1 缺失的小鼠对细胞凋亡和发育没有影响^[13],说明 Caspase-1 在细胞凋亡中没有作用^[14]。

Caspase-1 的功能和参与凋亡的 Caspase 在调控细胞命运中的功能类似。低水平激活凋亡 Caspase 可以阻止细胞死亡,调控 B 细胞和 T 细胞增殖和分化,并控制树突状巨噬细胞(dendritic cell, DC) 成熟^[15]。低水平激活 Caspase-1 具有刺激细胞生长、

抑制胞内菌生长和诱导炎症性细胞因子产生的作用。当 Caspase-1 激活超过一定阈值后,细胞发生 Pyroptosis 并释放细胞内炎症性成分。而参与凋亡的 Caspase 如 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-8 则并不参与 Pyroptosis。并且参与凋亡的 Caspase 的底物如 ADP-ribose 和 ICAD 在 Pyroptosis 中并没有参与蛋白酶水解。最后 Pyroptosis 细胞中并没有通过完整的线粒体丢失和细胞色素 c 释放来激活凋亡 Caspase。大部分关于 Pyroptosis 的研究都是在巨噬细胞中进行的,目前在人和小鼠的巨噬细胞和 DC 中都已显示依赖于 Caspase-1 的 Pyroptosis 死亡^[16-17]。然而 Caspase-1 在其它细胞如角质细胞和肠上皮细胞中也表达,但并不清楚这些细胞是否在病原菌刺激下也发生 Pyroptosis^[18]。小鼠巨噬细胞通过招募活化的 Caspase-1 与炎症体复合物结合,结合后的炎症体复合物被激活^[19]。目前已发现多个经典的炎症体复合物,这些复合物通过 NLRP1、NLRP3、NLRC4 或 AIM2 等蛋白装配成炎症体复合物^[20-21]。

目前大多数对炎症体激活和 Pyroptosis 的研究都是运用 Caspase-1 缺失小鼠,最初这种缺失的小鼠同时缺失了相邻无功能的 Caspase-11。但随后研究显示在只缺失 Caspase-11 小鼠中,大肠杆菌和霍乱弧菌等细菌感染中诱导细胞因子产生和细胞 Pyroptosis 中 Caspase-11 起到关键作用^[22]。根据激活的起始信号不同,细胞内信号既可以通过激活 Caspase-1,也可以通过激活 Caspase-11 来诱导细胞发生 Pyroptosis,但招募 Caspase-11 激活的上游信号还未知。同时那些导致细胞发生 Pyroptosis 的 Caspase 的剪切底物也未知。Caspase-1 并不参与小鼠 Caspase-11 诱导的细胞 Pyroptosis,但 Caspase-11 能通过 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 组成的炎症体促进促炎症细胞因子 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的剪切,和诱导 IL-1 β 分泌不同,Caspase-11 介导细胞发生 Pyroptosis 不需要 NLRP3 炎症体的激活,为了和 Caspase-1 激活的炎症体区别,Kayagaki et al^[22] 将 Caspase-1 激活的炎症体称为经典的炎症体激活,而 Caspase-11 激活的炎症体称为非经典炎症体激活。

3.3 不同炎症体复合物激活机制 炎症体复合物是 Caspase-1 激活所必须的平台,目前已经鉴定出各种不同的炎症体复合物。这些炎症体复合物包含 3 种蛋白,分别是感应蛋白(如 NLRs、AIM2、RIG-I 等)、接头蛋白 ASC 和效应分子 pro-caspase-1。许多炎症体招募含有 CARD 和 PYD 结构域的接头蛋白

ASC, 该蛋白通过 CARD-CARD 和 PYD-PYD 结构域相互作用和炎症体其它蛋白相结合^[23]。ASC 通过 CARD-CARD 结构域招募 procaspase-1 和 ASC 结合形成二聚体, 随后自我蛋白酶剪切 pro-caspase-1 为 p10 和 p20 两个亚基。激活的 Caspase-1 随后剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 为成熟的 IL-1 β 和 IL-18 并诱导细胞发生 Pyroptosis。

NLRP3 炎症体是目前研究最多的一个炎症体。其被许多 PAMPs 激活, 如细胞外 ATP、尿酸、病毒 DNA 和 RNA 等。然而 NLRP3 蛋白识别这么多的 PAMPs 的信号机制还未知, 可能是宿主细胞通过一个或多个其它蛋白识别这些不同的激动剂。目前普遍认为在小鼠巨噬细胞中 NLRP3 炎症体激活需要双重信号刺激。因为 NLRP3 基因在这些细胞中表达量低, 首先需要有一个预刺激信号来促进 NF- κ B 信号通路激活 NLRP3 表达。随后活化信号通过 PAMP 等诱导 NLRs 蛋白寡聚化, 并招募 ASC、活化 Caspase-1 形成炎症体复合物。活化的炎症体复合物诱导细胞释放促炎症细胞因子并诱导细胞发生 Pyroptosis。

NLRC4 蛋白则专一的识别细菌鞭毛蛋白 (flagellin) 和 III 型分泌系统成分。虽然激活 pro-IL-1 β 成熟需要接头蛋白 ASC, 然而在 NLRC4 蛋白介导的 Pyroptosis 中不需 ASC 蛋白参与。NLRC4 蛋白能通过 CARD 结构域招募 pro-caspase-1, 但并不需要 Procaspase-1 剪切为 p10 和 p20 两个亚基。在没有 ASC 的参与下, 未剪切但有催化活性的 Caspase-1 能诱导细胞发生 Pyroptosis, 但并不对细胞因子 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 进行剪切^[19-24]。推测机制是 Caspase-1 通过在细胞内弥散的分布来剪切未知的底物诱导细胞发生 Pyroptosis。

NLRP1b 能识别检测炭疽致死毒素, 但 NLRP1b 并不是通过识别毒素的结构来激活 Caspase-1, 因为致死毒素催化亚基点突变后虽然保持原有结构但不能激活 Caspase-1, 有可能是毒素的蛋白酶活性是激活 Caspase-1 所必须的^[25]。小鼠 NLRP1a、NLRP1b 和 NLRP1c 因缺乏 PYD 结构域而不需要 ASC 蛋白参与, 但人类 NLRP3 蛋白含有 PYD 结构域则需要 ASC 蛋白作用诱导细胞发生 Pyroptosis。

AIM2 是 HIN200 (200 个氨基酸重复) 家族成员, 由氨基末端 PYD 结构域和碳末端 HIN200 结构域组成。AIM2 特异识别细胞质 DNA^[26-27]。AIM2 通过 HIN200 结构域和 dsDNA 结合后通过 PYD-PYD 结构域招募 ASC 蛋白, 并和 Caspase-1 蛋白结

合。活化后的 Caspase-1 诱导细胞分泌 IL-1 β 和 IL-18, 并诱导细胞发生 Pyroptosis。

4 Pyroptosis 在人类疾病中作用

4.1 Pyroptosis 在病原感染中的作用 细胞发生 Pyroptosis 是调节宿主和病原相互作用的一个重要因素, 也是最基本且进化保守的防御策略。消除感染的细胞对宿主和病原起到两方面作用, 它们分别利用不同的策略来进行相互调节。巨噬细胞在病原菌如伤寒沙门氏菌、李斯特菌和绿脓杆菌等细菌感染中发生 Pyroptosis, 一方面宿主通过 Pyroptosis 和促炎症细胞因子分泌共同作用来清除病原体。另一方面细胞发生 Pyroptosis 有利于限制病原菌复制、减少细菌感染范围并最终达到抑制病原菌感染作用。芽孢杆菌感染能诱导巨噬细胞发生依赖于 NLRP1b 和 Caspase-1 的 Pyroptosis^[28]。Pyroptosis 在病毒感染中也起到关键作用。登革热病毒感染人 CD14⁺ 单核细胞能诱导依赖于 NLRP3 的 Pyroptosis^[29], 发生 Pyroptosis 后能限制登革热病毒在宿主中的感染范围。

4.2 Pyroptosis 在免疫性疾病中的作用 吡啉相关周期热综合征 (cryopyrin-associated periodic syndromes, CAPS) 是一类严重的自身免疫性疾病, 它的病因是炎症体中 NLRP3 蛋白发生了突变。含有 NLRP3 基因突变的患者通过 IL-1 β 抗体中和能得到有效的治疗, 说明过量的细胞因子产生而引起该疾病。并且这些细胞因子的产生依赖于 Caspase-1 的激活, 同时 Pyroptosis 也参与了 NLRP3 基因突变引起的该疾病^[30]。在化疗中引起的造血压力下, 激活的 NLRP1a 引起血球减少、骨髓发育不全并伴随着免疫抑制, 同时伴随着由 IL-1 β 和 IL-18 引起的致死的炎症性疾病。NLRP1a 炎症体在造血祖细胞中表达, 激活后引起这些细胞发生 Pyroptosis。激活的 NLRP1a 诱导由 Caspase-1 和 IL-1 β 引起的致死的炎症性疾病。另一方面在没有 IL-1 β 引起的炎症中, 激活 NLRP1a 仍然能诱导造血祖细胞发生 Pyroptosis 导致白细胞在稳定状态。说明通过抑制 NLRP1a 炎症体激活引起的 Pyroptosis 能减轻化疗过程中引起的贫血、白细胞减少和免疫抑制。

4.3 Pyroptosis 在肿瘤治疗中的作用 不仅巨噬细胞能发生 Pyroptosis, 其它类型的细胞如肿瘤细胞也能发生 Pyroptosis^[14]。肝 X 受体激动剂 T0901317 能通过诱导肿瘤细胞发生 Pyroptosis 来抑制肿瘤生长^[31]。研究显示 T0901317 诱导 Pyroptosis 的机制

为 T0901317 和肝 X 受体 β (LXR β) 结合后诱导 LXR β 和 Pannexin1 结合后, Pannexin1 通道打开并释放 ATP, 释放的 ATP 通过 P2X7 受体诱导 NLRP3 炎症体装配后激活 Caspase-1 并诱导细胞发生 Pyroptosis。在人类黑色素瘤细胞中, NLRP3 炎症体持续激活并剪切 Caspase-1。在晚期人黑色素瘤细胞中, 细胞自发分泌 IL-1 β 和发生 Pyroptosis, 伴随着自我炎症性疾病。和巨噬细胞不同的是这些黑色素细胞不需要外在的刺激就可激活 NLRP3 炎症体。这些结果说明 IL-1 β 介导的自我炎症对人类黑色素瘤的发生和发展起到关键作用, 而抑制炎症体的激活是治疗黑色素瘤的一条可选治疗方案^[31]。

5 结语

Pyroptosis 是最近在被细菌感染的巨噬细胞中发现的一种新型程序性死亡。这种程序性死亡的最关键特征是依赖于 Caspase-1 的激活及炎症体的形成。各种 PAMPs 通过不同途径能分别被不同的病原识别受体所识别, 随后通过各种信号招募接头蛋白 ASC 和 Caspase-1 形成炎症体。激活的 Caspase-1 通过对 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的剪切使其转变成促炎症性细胞因子 IL-1 β 和 IL-18, 诱发胞核浓缩及细胞肿胀并发生 Pyroptosis。

参考文献

- [1] Zychlinsky A, Prevost M C, Sansonetti P J. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages [J]. *Nature*, 1992, 358 (6382): 167-9.
- [2] Cookson B T, Brennan M A. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3): 113-4.
- [3] Brough D, Rothwell N J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(pt5): 772-81.
- [4] Eltzschig H K, Macmanus C F, Colgan S P. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18(3): 103-7.
- [5] Lopez-Castejon G, Young M T, Meseguer J, et al. Characterization of ATP-gated P2X7 receptors in fish provides new insights into the mechanism of release of the leaderless cytokine interleukin-1 β [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(6): 1286-99.
- [6] Mariathasan S, Weiss D S, Newton, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP [J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 228-32.
- [7] Molofsky A B, Byrne B G, Whitfield N N, et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection [J]. *J Exp Med*, 2006, 2039(4): 1093-104.
- [8] Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger [J]. *Science*, 2010, 327(8963): 296-300.
- [9] Spreafico R, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvant [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(3): 638-42.
- [10] Villani A C, Lemire M, Fortin G, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(1): 71-6.
- [11] Kostura M J, Tocci M J, Limjuco G, et al. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(14): 5227-331.
- [12] Black R A, Kronheim S R, Merriam J E, et al. A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 β [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(10): 5323-6.
- [13] Li P, Allen H, Banerjee S, et al. Mice deficient in IL-1 β converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock [J]. *Cell*, 1995, 80(3): 401-11.
- [14] Bergsbaken T, Fink S L, Cookson B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2): 99-109.
- [15] Siegel R M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(4): 308-17.
- [16] Edgeworth J D, Spencer J, Phalipon A, et al. Cytotoxicity and interleukin-1 β processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells [J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(5): 1464-71.
- [17] Fink S L, Bergsbaken T, Cookson B T. Anthrax lethal toxin and *Salmonella* elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis *via* distinct mechanisms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(11): 4312-7.
- [18] Elinav E, Strowig T, Kau A L, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis [J]. *Cell*, 2011, 145(5): 745-57.
- [19] Broz P, von Moltke J, Jones J W, et al. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing [J]. *Cell Host Microbe*, 2010, 8(6): 471-83.
- [20] Lamkanfi M. Emerging inflammasome effector mechanisms [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(3): 213-20.
- [21] Lamkanfi M, Dixit V M. Mechanisms and functions of inflammasomes [J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1013-22.
- [22] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-1 [J]. *Nature*, 2011, 479(7371): 117-21.
- [23] von Moltke J, Ayres J S, Kofoid E M, et al. Recognition of bacteria by inflammasomes [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: 73-106.
- [24] Case C L, Roy C R. Asc modulates the function of NLRC4 in response to infection of macrophages by *Legionella pneumophila* [J]. *MBio*, 2011, 2(4): e00117-11.
- [25] Boyden E D, Dietrich W F. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 240-4.
- [26] Fernandes-Alnemri T, Yu J W, Datta P, et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA [J]. *Nature*, 2009, 458(7237): 509-13.
- [27] Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC [J]. *Nature*, 2009, 458(7237): 514-8.

富血小板血浆对肌骨系统损伤修复作用的研究进展

刘一军, 涂俊综述 徐斌审校

摘要 韧带重建或修补术后腱骨愈合时间长及未能达到正常止点结构一直是个有待解决的问题。因此就如何促进腱骨愈合, 近年来已引起广泛的关注。富血小板血浆 (PRP) 来源于自身外周血液, 含有高浓度的血小板, 血小板中储存有大量的生长因子, 有促进组织愈合和再生的潜能。因此其在腱骨再生修复领域得到广泛的应用, 其临床效果及发挥作用的机制尚未确定, 一些主要问题仍待解决, 甚至还出现了相互矛盾的结果。现就 PRP 在骨、肌腱或韧带组织损伤修复及腱骨愈合中的作用作一综述。

关键词 富血小板血浆; 再生与修复; 韧带; 腱损伤; 腱骨愈合

中图分类号 R 687

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0461-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.036

富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 来源于自身外周血液, 含有高浓度的血小板, 血小板中储存有大量的生长因子, 有促进组织愈合和再生的能力。血小板分泌的生长因子包括血小板来源的生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子 (insulinlike growth factor-I, IGF-I)、转化生长因子 (transforming growth factor β -I, TGF β -I)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial factor, VEGF)、肝细胞生长因子 (hepatic growth factor, HGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor,

bFGF), 通过与特定的细胞相互作用有促进多种组织愈合的潜能。这些不同的生长因子致使 PRP 具备多重作用, 包括增强合成代谢、骨与血管的重塑、细胞增殖、血管再生、抗炎及细胞分化。并且取材方便, 安全价廉。所以目前 PRP 在组织损伤修复再生领域得到广泛关注。现对 PRP 在骨、肌腱或韧带组织损伤修复和腱骨愈合中的作用作一综述。

1 血小板浓缩液的分类及制备

血小板浓缩液的制作去除了无临床作用的成分, 比如大部分的红细胞, 而保留并浓聚了有治疗作用的成分, 如血小板、生长因子、白细胞、纤维蛋白原或纤维蛋白。实际上血小板浓缩液基于白细胞和纤维蛋白的成分被分为 4 个家族^[1]: 纯的富血小板血浆 (pure platelet-rich plasma, P-PRP)、富白细胞和血小板血浆 (leukocyte-and platelet-rich plasma, L-PRP)、纯的富血小板纤维蛋白 (pure platelet-rich fibrin, P-PRF)、富白细胞和血小板纤维蛋白 (leukocyte-and platelet-rich fibrin, L-PRF)。P-PRP 是指富含生长因子的血浆, L-PRP 通常以胶体或液体的形式存在, 包被有低密度的胶原蛋白网并含有白细胞。P-PRF 又被称为富血小板纤维蛋白基质 (platelet-rich fibrin matrix, PRFM), L-PRF 包含有高密度的纤维蛋白网并仅以胶体形式存在。

P-PRP 的制备方法: Anitua^[2]法: 第一步收集静脉血约 5 ml, 2 800 r/min 离心 8 min, 全血分为三层: 底部的红细胞层, 中间的“黄衣层”和上层的无细胞血浆层。去除上层 1 ml 乏血小板血浆层 (platelet-poor plasma, PPP), 剩下的血浆层 (即“黄衣层”之上) 即是 P-PRP。但是此方法为人工操作, 多次移液, 误差较大。另外可以使用特定的细胞分离

2016-08-02 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1208085MH157)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院运动创伤与关节镜科, 合肥 230022

作者简介: 刘一军, 男, 硕士研究生;

徐斌, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: youchen100@126.com

[28] Moayeri M, Haines D, Young H A, et al. Bacillus anthracis lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice [J]. J Clin Invest, 2003, 112(5): 670-82.

[29] Chen S T, Lin Y L, Huang M T, et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease [J]. Nature, 2008, 453(7195): 672-6.

[30] Brydges S D, Broderick L, McGeough M D, et al. Divergence of

IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies [J]. J Clin Invest, 2013, 123(11): 4695-705.

[31] Lin C Y, Vedin L L, Steffensen K R, et al. The emerging roles of liver X receptors and their ligands in cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20(1): 61-71.