

# 单钠尿酸盐晶体介导炎性反应机制的研究进展

易婷婷 综述, 蒋兴亮<sup>△</sup> 审校(川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000)

【关键词】 尿酸盐晶体; 单钠尿酸盐; 炎症; 机制

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.05.050 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)05-0686-03

早在一个世纪以前,加洛德医师指出尿酸盐的沉积是导致痛风的原因而不是结果,而 Hollander 等在痛风患者的关节滑液中检出单钠尿酸盐(MSU)晶体,进一步证实了 MSU 晶体是引起痛风的原因之一<sup>[1]</sup>。因此,MSU 晶体的致炎机制受到了风湿和免疫学家的广泛关注。固有免疫系统在感染和损伤所介导的炎性反应中占主导作用,并且能快速启动宿主防御反应,趋化获得性免疫相关细胞移动至炎症部位而引起免疫应答。研究发现,MSU 晶体可作为一种危险相关模式分子(DAMPs),通过与病原相关模式分子(PAMPs)相似的方式激活固有免疫系统,诱导宿主产生炎性反应<sup>[2-4]</sup>。近年来,MSU 晶体作为强烈的炎症刺激物介导炎性反应的机制已得到了深入研究并取得了很大进展。因此,本文对 MSU 晶体介导炎性反应的相关机制研究进展进行简要综述。

## 1 MSU 晶体的形成

正常情况下,人体的细胞中含有较高水平的尿酸,当局部细胞受到损伤或发生死亡时,随着核酸分子的释放和嘌呤代谢的加强,体内局部尿酸水平升高并达到饱和状态,最终导致 MSU 晶体的析出。MSU 晶体沉积是痛风性关节炎发病的中心环节,但目前对于 MSU 晶体沉积的机制尚不完全清楚。MSU 晶体的沉积可能与体内尿酸浓度、温度、pH 值、离子强度、糖蛋白分子结构改变、创伤刺激、体内激素水平等有关。已有研究表明,MSU 晶体沉积还与部分血浆蛋白有密切关系<sup>[5-6]</sup>。Kam 等<sup>[5]</sup>首次报道血清 IgG 类抗体参与了 MSU 晶体的沉积。Kanevets 等<sup>[6]</sup>的小鼠模型研究也发现,IgM 类抗体促进可溶性尿酸在磷酸盐缓冲液中沉积和结晶。因此,除其他理化因素外,MSU 晶体与抗体等血浆蛋白的结合不仅影响晶体的形成,而且对晶体生物学功能的发挥产生重要作用。

## 2 MSU 晶体的致炎机制

### 2.1 白细胞介素 1(IL-1)介导的炎性反应

人体通过识别 PAMPs 或 DAMPs 启动固有免疫反应,而识别这些分子模式的受体称之为模式识别受体(PRRs)。PRRs 主要包括 Toll 样受体(TLRs)和 NOD 样受体(NLRs)。不同种类的 PRRs 能够识别不同的 PAMPs 或 DAMPs,其中 NLRs 除了能识别 PAMPs 外,还能识别胞内损伤危险信号<sup>[2]</sup>。目前已有研究证实,细胞或组织损伤所释放的 MSU 晶体可作为一种内源性危险信号,被巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞等固有免疫细胞所表达的 PRRs 所识别。固有免疫细胞识别 MSU 晶体后,经胞内一系列的信号转导,促进大量炎性细胞因子的产生,最终导致痛风患者出现强烈的炎性反应<sup>[7]</sup>。

MSU 晶体诱导炎性反应的过程也可诱导 IL-1 的产生<sup>[8-11]</sup>。活性状态的 IL-1 有 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  两种形式,二者具有共同的受体,即 IL-1 受体 1(IL-1R1)<sup>[8]</sup>。Chen 等<sup>[10]</sup>在嵌合体小鼠中的研究证明,在正常野生型小鼠接受 IL-1R1 $^{-/-}$ 或 MyD88 $^{-/-}$ 小鼠的骨髓后,MSU 导致的炎性反应没有明显改

变;但 IL-1R1 $^{-/-}$ 或 MyD88 $^{-/-}$ 小鼠接受正常小鼠的骨髓后,其炎性反应却明显减弱。由此可见,IL-1R1 和 MyD88 信号转导通路是 MSU 晶体诱导炎性反应所必需的,且非造血细胞(如内皮细胞)可能是介导白细胞介素产生和炎性反应发生的必要成员。在 MSU 介导的无菌性炎性反应中,IL-1 $\beta$  发挥了主要作用。IL-1 基因被激活后编码的是含 N 端前体序列的无活性前体分子。在含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-1)的酶切作用下,IL-1 前体分子切掉 N 端前体序列生成具有生物活性的 IL-1 $\beta$ 。活化的 IL-1 $\beta$  通过激活 IL-1R,增加趋化因子和其他炎症因子的表达,进而诱导中性粒细胞浸润至 MSU 沉积部位,并最终导致痛风炎性反应的产生和进展<sup>[3,11]</sup>。而关于 MSU 晶体介导 IL-1 $\beta$  产生的主要信号通路包括 Nod 样受体家族包含 pyrin 结构域蛋白 3(NLRP3)炎性体依赖的信号通路、TLRs 依赖的信号通路、组织蛋白酶 C 依赖的信号通路等。

### 2.1.1 NLRP3 炎性体依赖的信号通路

NLRP3 炎性体是迄今为止结构和功能最为明确的炎性体,主要由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、Caspase-1 组成,能识别多种病原体和胞内危险信号。Martinon 等<sup>[3]</sup>的体外研究发现,MSU 晶体可激活 NLRP3 炎性体,并导致巨噬细胞大量活化,促进 IL-1 $\beta$  的分泌;但在同样的刺激条件下,从 Caspase-1、ASC 或 NLRP3 基因敲除小鼠中分离的巨噬细胞却丧失了分泌 IL-1 $\beta$  的能力;将 MSU 晶体注射到这些基因敲除小鼠体内,则可导致其炎症部位的中性粒细胞浸润也明显减少。这一研究充分说明 NLRP3 炎性体信号通路在识别 MSU 晶体和触发炎性反应过程中有重要作用,但胞内 NLRP3 炎性体是如何感知胞外 MSU 晶体刺激的呢? 研究发现,在体外用细胞松弛素或秋水仙碱抑制巨噬细胞的吞噬作用可阻碍 NLRP3 的激活<sup>[12]</sup>。这说明巨噬细胞吞噬 MSU 晶体是诱导炎性反应的第一步,也在一定程度上解释了秋水仙素治疗急性痛风的原理。随着研究的深入,MSU 晶体通过激活 NLRP3 炎性体的致炎过程逐渐明确:巨噬细胞识别并吞噬 MSU 晶体,MSU 晶体激活 NLRP3 炎性体;NLRP3 炎性体通过其热蛋白结构域(PYD)与衔接蛋白 ASC 结合,ASC 通过 Caspase 招募结构域(CARD)与 Caspase-1 结合并使之活化,被活化的 Caspase-1 此时并不参与细胞的程序性凋亡,而是作为一种蛋白酶,剪切 IL-1 前体分子形成 IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$  再与 IL-1R 结合,招募中性粒细胞等炎性细胞聚集至炎症部位,产生大量的趋化因子和炎症细胞因子,引起炎症级联反应和组织损伤<sup>[3,12]</sup>。

NLRP3 炎性体的激活是 MSU 晶体致炎过程的关键环节,MSU 晶体激活 NLRP3 炎性体的机制在近年来也得到进一步的研究。活性氧(ROS)的产生、溶酶体膜通透性的改变导致组织蛋白酶 B 的释放、细胞内钾离子外流成为炎性体激活的 3 种主要模式。(1)巨噬细胞摄入刺激性颗粒(如硅、石棉、MSU 晶体),引起吞噬体内的 NADPH 氧化酶产生 ROS,通过

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: jiangxl\_666@163.com.

ROS 激活 NLRP3 炎性体。上述刺激性颗粒的拮抗剂能明显抑制 NLRP3 炎性体的激活,进一步证实了这一结论的可靠性<sup>[13]</sup>。此外,Zhou 等<sup>[14]</sup>的研究也发现,被细胞吞噬的刺激物能刺激线粒体合成 ROS 增加,而 ROS 可能通过改变胞内氧化还原势能而最终激活 NLRP3 炎性体。(2)巨噬细胞吞噬 MSU 晶体等刺激颗粒后,其吞噬体随即发生酸化,并导致酸性蛋白酶激活和大量组织蛋白酶 B 释放,释放的组织蛋白酶 B 能激活 NLRP3 炎性体。也有研究发现,含有刺激物的吞噬体,其内容物可释放进入胞质中,而吞噬体的内容物也能有效激活 NLRP3 炎性体<sup>[12]</sup>。(3)MSU 晶体可能使吞噬细胞胞内的 ATP 释放到胞外,胞外的 ATP 与细胞膜上 P2X7 嘌呤受体结合并活化 P2X7 受体,诱导钾离子选择性通道快速开放,引起胞内钾离子大量外流,通过钾离子浓度的改变激活 NLRP3 炎性体<sup>[15]</sup>。

体外细胞培养实验证实,IL-1 $\beta$  的产生完全依赖于炎性体,缺少炎性体的巨噬细胞在受到 MSU 晶体或者其他类似物质的刺激时,不能分泌成熟的 IL-1 $\beta$ ;但在遗传性缺失炎性体的动物体内,IL-1 $\beta$  介导的炎性反应仅有一定程度的降低而已<sup>[16]</sup>。这表明在动物体内尚存在其他机制参与白细胞介素前体的剪切和炎性反应的发生。

**2.1.2 TLRs 介导的炎性通路** TLRs 是细胞膜上的一种 PRRs,其主要作用是识别各种 PAMPs,也是固有免疫系统的重要组成部分和机体抵抗感染性疾病的第一道屏障。MSU 晶体可作为一种内源性“危险信号”直接被 TLRs 识别,或者与某些细胞表面蛋白相结合而激活 TLRs。Liu-Bryan 等<sup>[17]</sup>研究发现,在 MSU 晶体导致的炎性反应动物模型中,TLR2、TLR4 或 MyD88 基因敲除小鼠的炎性细胞因子,如 IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 和转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 表达降低。Scott 等<sup>[18]</sup>的研究表明,MSU 能与巨噬细胞表面的 CD14 结合,通过激活 P38 蛋白而增强巨噬细胞 IL-1 $\beta$  和 CXCL1 的表达;而 CD14 基因敲除的小鼠中,MSU 晶体介导巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  的能力明显下降,并且在相同小鼠的气囊模型中,其白细胞浸润能力也显著降低。但是,也有研究对 MSU 晶体激活 TLRs 信号通路提出了质疑。Chen 等<sup>[10]</sup>将 MSU 晶体注入 TLRs 基因敲除的小鼠和正常野生型小鼠腹腔中,结果发现,TLRs 缺陷小鼠体内的中性粒细胞在炎性反应部位的聚集并未受到抑制,同时还可检出核转录因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 水平的升高,提示 TLRs 并非 MSU 晶体介导炎性反应所必需的,可能 TLRs 并未直接与 MSU 晶体结合,而是通过另外一些未知细胞受体参与了 MyD88 依赖的 IL-1 $\beta$  分泌。不同研究得到的结论截然不同,可能是由于上述两种模型所涉及的反应细胞不同和局部环境因素不同。尽管 MSU 晶体是否激活 TLRs 以及激活 TLRs 的方式还存在争议,但 MyD88 依赖的信号通路是 MSU 介导炎性反应过程中所必不可少的。Chen 等<sup>[10]</sup>的研究同时证实,在 MyD88 缺陷小鼠体内,IL-1 $\beta$  表达水平减少了 92%,但在 TIRAP/Mal、TRIF 和 TRAM 缺陷小鼠体内,IL-1 $\beta$  的分泌量无明显减少。因此,MSU 作为损伤细胞释放的危险信号,可通过直接激活或在某些细胞表面蛋白(如 CD14)的协同下激活 TLRs,活化的 TLRs 则通过 MyD88 依赖的信号通路传递信号,激活 NF- $\kappa$ B 和活化蛋白 1(AP-1),促进炎性细胞因子、趋化因子、黏附分子的基因转录,最终引起 IL-1 $\beta$  等炎症因子的释放。

**2.1.3 组织蛋白酶 C 依赖的信号通路** 在体外,除了 Caspase-1,还有其他蛋白酶可使 IL-1 转变为有生物活性的 IL-1 $\beta$ ,如嗜中性粒细胞丝氨酸蛋白酶(包括弹性蛋白酶、组织蛋白

酶、蛋白酶 3)、肥大细胞糜蛋白酶和基质金属蛋白酶。上述蛋白酶绝大多数是丝氨酸蛋白酶,主要以无活性的酶原形式存在,需要被进一步激活后才能转变至有活性的功能状态。而组织蛋白酶 C 正是这些酶原的激活物。研究发现,将胶原抗体或免疫复合物注入缺乏组织蛋白酶 C 的小鼠体内后,只能诱导产生少量的 IL-1 $\beta$  和促发微弱的炎性反应,而注入重组 IL-1 $\beta$  则可恢复正常的炎性反应;此外,在一些刺激性颗粒的作用下,缺乏组织蛋白酶 C 和 Caspase-1 的小鼠均表现出严重的 IL-1 $\beta$  产生缺陷<sup>[19]</sup>。也有研究证明,炎性关节炎和 MSU 介导的炎性反应模型中,上述丝氨酸蛋白酶的化学抑制剂可以抑制 IL-1 $\beta$  的产生<sup>[20]</sup>。由此可见,组织蛋白酶 C 在 IL-1 $\beta$  的产生过程中起着重要作用,其过程可能是:在 MSU 晶体的刺激下,组织蛋白酶 C 激活多种丝氨酸蛋白酶,活化的丝氨酸蛋白酶剪切 IL-1 形成具有生物活性的 IL-1 $\beta$ ,最终促进炎性反应。

**2.2 其他细胞因子介导的炎性反应** 除了 IL-1 $\beta$ ,其他一些炎性细胞因子和趋化因子也参与了 MSU 晶体介导的炎性反应。研究发现,痛风患者关节滑液中可以检出高水平的 TNF- $\alpha$  和 IL-6,且 MSU 晶体可在体外诱导未分化的单核细胞分泌 TNF- $\alpha$  和 IL-6<sup>[21]</sup>。大量炎症介质的释放导致炎性细胞趋化聚集、毛细血管通透性增高、淋巴细胞浸润等。尽管 TNF- $\alpha$  在炎性反应部位确实大量存在,但通过干预 TNF- $\alpha$  相关信号转导治疗痛风性关节炎却没有取得明显的疗效。IL-6 具有促进和放大炎性反应的作用,但 IL-6 在痛风性炎性反应中的角色还不清楚。趋化因子在痛风炎性反应中也发挥重要作用。IL-8 结合受体 CXCR2 趋化并激活中性粒细胞,促进中性粒细胞的溶酶体酶活性和吞噬作用,导致机体局部炎性反应。将 MSU 晶体注入小鼠的皮下气囊导致小鼠可诱导产生中性粒细胞趋化为主的炎性反应,但该炎性反应对趋化因子配体 CXCR2 具有一定的依赖性。在 CXCR2 基因敲除小鼠体内无法诱导产生中性粒细胞炎性反应即可证实这一结论<sup>[22]</sup>。

**2.3 MSU 晶体激活补体经典途径及替代途径致炎** MSU 晶体也可通过激活补体经典及替代途径引起炎性反应。研究发现 MSU 晶体表面结合的多肽类物质以 C1q 居多,也含有少量 C1r 和 C1s<sup>[23]</sup>。MSU 晶体通过与 C1q 结合,活化补体经典途径而引发炎性反应。另外,MSU 晶体也能与 C5 及 C5a 结合,从而促进 C5b-C9 膜攻击复合物的形成,促进中性粒细胞的聚集引起炎性反应。Hasselbacher 等<sup>[24]</sup>发现,MSU 还可以活化 C3,而且还发现痛风患者的尿酸结晶中也含有补体 C3;在缺乏 C2 的人血清中,MSU 可引起 B 因子及 C3 的裂解,从而进一步证实了 MSU 可引起补体替代途径的激活。Tramontini 等<sup>[23]</sup>的研究发现,C6 缺乏可导致 IL-18 的生成明显减少,中性粒细胞趋化作用明显减弱,炎性反应也明显减轻。这些结果均表明补体在 MSU 介导的炎性反应中起重要作用。

**2.4 MSU 晶体激活树突状细胞(DCs)介导炎性反应** DCs 是人体内功能最强的专职抗原递呈细胞(APC)。DCs 作为信使,可将抗原信息传递至 T 细胞,并具有活化 T 细胞的功能,极少量 DCs 就可以激发强大的 T 细胞反应。研究表明,MSU 晶体可作为内源性危险信号激活 DCs,也可发挥免疫佐剂的作用增强免疫应答反应<sup>[25]</sup>。DCs 在正常情况下低水平表达共刺激分子。然而,当细胞感染或损伤时,DCs 能从非淋巴组织进入次级淋巴组织并逐渐成熟,同时上调组织相容性复合物(MHC)和共刺激分子(如 CD40、CD80、CD86 等)的表达,从而能有效地将抗原递呈至初始型 T 细胞,并使之活化,发挥其调节免疫应答的作用。研究证明,将损伤细胞和抗原同时注入实验动物体内,T 细胞和 B 细胞反应均被激活,而 MSU 结晶则

是从损伤细胞中分离出的免疫促进因子之一<sup>[25]</sup>。其机制可能是:MSU 结晶直接与 DCs 表面的脂质双分子层结合,改变脂质的排列,进而引起细胞内具有有丝氨酸激酶活性的受体(ITAMs)聚集,募集酪氨酸激酶(SyK),激活磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K),引起 DCs 的活化,而活化的 DCs 最终通过刺激 T、B 细胞而促进炎症反应<sup>[25]</sup>。

### 3 小 结

综上所述,大量研究阐明了 MSU 晶体介导炎症反应的机制和相关信号通路,其中既包括备受关注的 NLRP3 炎性体依赖的信号通路,也有非 NLRP3 炎性体依赖的独立信号通路。这些信号通路之间可能相互联系、相互影响,形成了非常复杂的炎性网络系统。通过深入研究该炎性网络系统,有助于为痛风和其他炎症性疾病提供新的治疗靶点,为新药的研制和探索新的治疗方法提供更加有力的理论根据。控制血尿酸、干预炎症反应过程将成为治疗炎症反应疾病的新方向。

### 参考文献

[1] Busso N, So A. Mechanisms of inflammation in gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(2):206-209.

[2] Xie GC, Duan ZJ. Signal transduction of innate immunity to virus infection[J]. *Bing Du Xue Bao*, 2012, 28(3):303-310.

[3] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome[J]. *Nature*, 2006, 440(7081):237-241.

[4] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes[J]. *Cell*, 2010, 140(6):821-832.

[5] Kam M, Perl-Treves D, Sfez R, et al. Specificity in the recognition of crystals by antibodies[J]. *J Mol Recognit*, 1994, 7(4):257-264.

[6] Kanevets U, Sharma K, Dresser K, et al. A role of IgM antibodies in monosodium urate crystal formation and associated adjuvanticity[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4):1912-1918.

[7] Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 9(1):13-23.

[8] Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin[J]. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142(5):1-10.

[9] Yang L, Guo XG, Du CQ, et al. Interleukin-1 beta increases activity of human endothelial progenitor cells: involvement of PI3K-Akt signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2012, 35(4):1242-1250.

[10] Chen CJ, Shi Y, Hearn A, et al. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8):2262-2271.

[11] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27:519-550.

[12] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization[J]. *Nat Immunol*,

2008, 9(8):847-856.

[13] Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica[J]. *Science*, 2008, 320(5876):674-677.

[14] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2011, 469(7329):221-225.

[15] Ayna G, Krysko DV, Kaczmarek A, et al. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e40069.

[16] Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(12):3651-3662.

[17] Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, et al. TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation[J]. *J Immunol*, 2005, 174(8):5016-5023.

[18] Scott P, Ma H, Viriyakosol S, et al. Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals[J]. *J Immunol*, 2006, 177(9):6370-6378.

[19] Kono H, Orłowski GM, Patel Z, et al. The IL-1-dependent sterile inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C[J]. *J Immunol*, 2012, 189(7):3734-3740.

[20] Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(12):3651-3662.

[21] Scanu A, Oliviero F, Ramonda R, et al. Cytokine levels in human synovial fluid during the different stages of acute gout: role of transforming growth factor beta1 in the resolution phase[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(4):621-624.

[22] Terkeltaub R, Baird S, Sears P, et al. The murine homolog of the interleukin-8 receptor CXCR-2 is essential for the occurrence of neutrophilic inflammation in the air pouch model of acute urate crystal-induced gouty synovitis[J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(5):900-909.

[23] Tramontini N, Huber C, Liu-Bryan R, et al. Central role of complement membrane attack complex in monosodium urate crystal-induced neutrophilic rabbit knee synovitis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(8):2633-2639.

[24] Hasselbacher P. C3 activation by monosodium urate monohydrate and other crystalline material[J]. *Arthritis Rheum*, 1979, 22(6):571-578.

[25] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells[J]. *Nature*, 2003, 425(6957):516-521.