

• 综 述 •      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.15.032

网络首发    http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190329.1037.005.html(2019-03-29)

# 脂多糖诱导 Kupffer 细胞激活、焦亡及耐受机制研究进展<sup>\*</sup>

谭定勇<sup>1</sup>,秦凡博<sup>2</sup>综述,程 瑶<sup>2</sup>,龚建平<sup>2△</sup>审校

(1.重庆市万州区人民医院普外科 404000;2.重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

**[摘要]** Kupffer 细胞是定植于肝脏中的巨噬细胞,作为一类庞大的巨噬细胞群体,它与天然免疫和获得性免疫有密切关联。Kupffer 细胞可被革兰阴性菌脂多糖(LPS,内毒素的主要构成)激活,现发现细胞外的 LPS 与细胞内的 LPS 均可以通过不同途径激活巨噬细胞,参与炎症介质的释放及导致焦亡。内毒素耐受是机体在面对感染时的一种自身防御机制,可以避免炎症过度激活带来的组织损伤,而 Kupffer 细胞则在内毒素耐受中扮演着重要的角色,近年来由于非编码 RNA 及蛋白泛素化修饰等研究不断进展,内毒素耐受的机制也因此有了新的研究进展。该文总结了 LPS 对 Kupffer 细胞的激活机制及近年来关于焦亡和内毒素耐受机制的研究进展。

**[关键词]** 枯否细胞;脂多糖类;激活机制;细胞焦亡;免疫耐受;非编码 RNA

**[中图法分类号]** R329.2      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)15-2641-05

Research advances of activation,pyroptosis and endotoxin tolerance mechanisms of  
Kupffer cells induced by lipopolysaccharide<sup>\*</sup>

TAN Dingyong<sup>1</sup>,QIN Fanbo<sup>2</sup>,CHENG Yao<sup>2</sup>,GONG Jianping<sup>2△</sup>

(1. Department of General Surgery, People's Hospital of Wanzhou District, Chongqing 404000, China;  
2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of  
Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** Kupffer cells are known as liver inherent macrophages. As a large group of macrophages, they are closely related to innate and acquired immunity. Kupffer cells can be activated by the lipopolysaccharide (LPS). It has been observed that both extracellular LPS and intracellular LPS can activate macrophages through different signaling pathways and participate in the release of inflammatory mediators and cause pyroptosis. Endotoxin tolerance is a self-defense mechanism in the body in the face of infection, which can avoid tissue damage caused by excessive activation of inflammation, while Kupffer cells play an important role in endotoxin tolerance. In recent years, due to the advances in research fields such as non-coding RNA and protein ubiquitination, the mechanism of endotoxin tolerance has also made new research advance. Therefore, this review summarized the activation mechanism of LPS on Kupffer cells and recent advances in the mechanisms of pyroptosis and endotoxin tolerance.

**[Key words]** Kupffer cells; lipopolysaccharides; activation mechanism; pyroptosis; immune tolerance; non-coding RNA

Kupffer 细胞是一类定植于肝脏中的巨噬细胞,是人体巨噬细胞中最大的一个群体,它的主要功能为吞噬病原菌、微生物、坏死细胞碎片及作为抗原呈递细胞发挥作用。由于肝脏解剖位置的特殊性,使得其长期暴露于肠道来源的各种病原微生物环境中,因此,Kupffer 细胞便组成了肝脏在面对各种病原微生物时的第一道屏障,因为其特殊的功能使得它在先天免疫系统及获得性免疫系统中占据着重要的地位<sup>[1]</sup>。Kupffer 细胞中可以表达多种模式识别受体(PRRs),如表达在细胞膜上的 Toll 样受体(TLRs),细胞质中的 Nod 样受体(NLRs)等,可以对细胞内或细胞外各种病原相关模式分子及危险相关模式分子进行识别,进而被激活。革兰阴性菌的细胞壁脂多糖(LPS)为内毒素的主要构成,它是众多可以激活 Kupffer 细胞使其发挥特定功能的物质中最经典的一类,LPS 既往对于 Kupffer 细胞激活的研究多是聚焦于其依赖的 TLRs 途径,近年来在关于巨噬细胞的研究上,发现了另外一种非 TLRs 依赖的信号通路,而这条信号通路

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金项目(81701950)。 作者简介:谭定勇(1966—),副主任医师,本科,主要从事普外科的基础及临床方面的研究。

<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:gongjianping11@126.com。

的激活依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 11(caspase-11)并会伴随炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和 IL-18 的释放,细胞本身经此途径激活后则会发生一种炎症形式的细胞死亡即细胞焦亡。Kupffer 细胞的激活与内毒素耐受的现象有很大联系,因为内毒素耐受依赖于各种调节因素对 Kupffer 细胞激活通路上各个环节的精密调控,这其中包括了许多负性调节蛋白的表达改变,以及近年来广受关注的肿瘤坏死因子受体相关因子 3(TRAF3)泛素化修饰和非编码 RNA 在其中的作用。

## 1 LPS 诱导 Kupffer 细胞激活的信号通路

### 1.1 细胞外 LPS 激活 Kupffer 细胞的信号通路

Kupffer 细胞可以被多种刺激物激活,如革兰阴性菌的细胞壁 LPS、细菌及真菌的  $\beta$  葡聚糖、补体因子 C3a 和 C5a 等,激活的 Kupffer 能够上调多种炎症介质如 IL-6、IL-12、IL-18、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )等<sup>[2]</sup>。在这些众多的激活 Kupffer 细胞的刺激物中,LPS 是最为经典且研究得最深入的一种,LPS 主要通过作用于 TLRs 家族中的 TLR4 起到激活细胞的作用。Toll 蛋白最早是在 20 世纪 90 年代果蝇体内发现的一种参与天然免疫反应的蛋白,与果蝇类似,人类细胞中的 TLRs 是一种 I 型跨膜蛋白,它可以广泛识别各种病原体相关模式(PAMPs),如细菌、病毒的 DNA、RNA 及真菌等,是机体天然免疫的重要组成成分。在人类细胞中,被证实的 TLRs 有 10 种,肝脏中 Kupffer 细胞、内皮细胞、肝星状细胞及肝实质细胞等均大量表达 TLRs。LPS 引起的 TLR4 通路的激活方式目前大多认为是以下过程:血浆中的脂质结合蛋白(lipid-binding protein,LBP)与 LPS 相结合,将 LPS 运输到与锚定在脂质膜上脂筏区域中的 CD14 相结合,CD14 将 LPS 转运并与髓样分化因子 2(myeloid differentiation factor 2,MD2)相结合,最终形成 TLR4/MD2 复合物的二聚体,二聚体的形成是炎症开始的第一步<sup>[3]</sup>。最近,LI 等<sup>[4]</sup>揭示了一种影响 TLR4 活性的新机制,T3JAM(TRAF3-interacting JNK-activating modulator,T3JAM)可以作为一种分子钳来“收紧”TLR4,促进其向脂筏区域易位,最终增强巨噬细胞介导的炎症。LPS 通过与 TLR4 和 MD-2 作用形成的复合体随后会活化髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response gene 88,MyD88)依赖的下游通路或形成 TLR4 的内吞体。一方面,MyD88 被募集后进一步招募白细胞介素受体相关激酶 1(interleukin-1 receptor-associated kinase,IRAK1)、IRAK2、TNF 受体相关因子(TNF receptor-associated factor 6,TRAF6)等蛋白形成蛋白复合物,最终这个蛋白复合物可以分别激活核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)及 JNK/p38 MAPK 信号通路;另一方面,除了依赖于 MyD88 激活 NF- $\kappa$ B 和 JNK/p38 MAPK 通路外,LPS 被转位进入 TLR4 的内吞体内,

随后招募 TRIF、TRAF3 及其他蛋白,使得 INF 调节因子 IRF3 发生磷酸化,最终上调(INF- $\gamma$ )的表达<sup>[5]</sup>。

### 1.2 细胞内 LPS 激活 Kupffer 细胞的信号通路

Kupffer 细胞虽为人体主要的巨噬细胞群体,但专门针对细胞内 LPS 激活 Kupffer 细胞的信号通路相关研究仍较少,但一些对于 LPS 感染巨噬细胞的相关研究却能提示 Kupffer 细胞中也可能存在类似激活途径。既往很长一段时间研究者们认为 LPS 只能在细胞外作用于 TLRs 激活巨噬细胞,然而,KAYAGAKI 等<sup>[6]</sup>最早发现当小鼠巨噬细胞感染某些革兰阴性菌如大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌、福氏志贺菌后,会出现一种依赖于 caspase-11 的炎症因子释放,而且 caspase-11 可以杀死巨噬细胞内从囊泡逃逸出的这些细菌。这些现象说明了这些革兰阴性菌可能通过某个相同的病原体相关模式分子能够激活 caspase-11。caspase-11 在正常状态下的细胞中表达常较低,但可以使用不同的 TLRs 激动剂诱导 caspase-11 在细胞内表达升高,因此,HAGAR 等<sup>[7]</sup>和 KAYAGAKI 等<sup>[8]</sup>用不同的 TLRs 激动剂预处理 Kupffer 细胞后,使用电穿孔的方法,将革兰阴性菌共有的成分 LPS 转染进细胞,发现 caspase-11 被激活,此外,KAYAGAKI 等<sup>[8]</sup>还发现了是 LPS 的脂质 A 成分作用于 caspase-11 的 CARD 结构域才可以将其激活。因此,这两个独立的实验均证明了细胞内的 LPS 依赖于 caspase-11 可以激活 Kupffer 细胞。另外,在 LPS 是如何进入 Kupffer 细胞这个问题上,又有许多学者展开了研究。有观点认为,细胞内的鸟苷酸结合蛋白可以通过对包含革兰阴性菌的囊泡及包含 LPS 的外膜囊泡(out-membrane vesicles,OMVs)进行裂解使 LPS 在细胞内定位<sup>[9]</sup>。最近,DENG 等<sup>[10]</sup>发现在脓毒血症中,高迁移率族蛋白 1(HMGB1)可以结合 LPS 通过晚期糖基化终产物(RAGE)受体进入细胞质,随后通过溶酶体的作用使 LPS 在细胞质中释放出来<sup>[10]</sup>。除此之外,还有研究者认为 LPS 进入细胞可能还与 LBP 有关,因为他们发现当细胞外 LPS 浓度升高时,细胞质内的 LPS-LBP 复合物也会随之升高,但 LBP 介导 LPS 进入细胞的具体机制仍有待探索<sup>[11]</sup>。当细胞内的 LPS 或革兰阴性菌激活 caspase-11 后,会产生两方面的效应:一方面,活化的 caspase-11 可以介导 Kupffer 细胞发生炎症的程序性死亡,即细胞焦亡;另一方面,它可以通过激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白-凋亡相关颗粒样蛋白(NLRP3-ASC)复合体激活 caspase-1,从而使炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 成熟释放。由于既往的关于 NLRP3 经典炎症小体的激活与此激活途径有很大差别,故也将此途径称之为非经典 NLRP3 炎症小体激活通路。现普遍认为由 caspase-11 激活引起的钾离子外流是最关键的因素<sup>[12]</sup>。YANG 等<sup>[13]</sup>发现,活化的 caspase-11 可以通过切割细胞膜上的 pannexin-1 蛋白使钾离子

外流及 ATP 释放,钾离子外流使 NLRP3/ASC/caspase-1 通路激活,而 ATP 释放则与焦亡相关。除钾离子外,溶酶体中的组织蛋白酶 B 的释放也与 NLRP3 非经典炎症小体通路的激活相关,CHEN 等<sup>[14]</sup>发现在 Kupffer 细胞中,LPS 可能会使溶酶体膜结构的稳定性遭到破坏,使其中的组织蛋白酶 B 从中释放,而组织蛋白酶 B 的释放使 caspase-11 的激活增强,从而通过上述途径激活非经典 NLRP3 炎症小体,但 LPS 是如何影响溶酶体膜的结构还有待进一步探索。

## 2 细胞内 LPS 诱导的 Kupffer 细胞焦亡

细胞内 LPS 通过上述信号通路将巨噬细胞或 Kupffer 细胞激活之后,除了能够分泌多种炎症介质参与促炎或抗炎反应外,这些细胞内 LPS 还可以诱导巨噬细胞发生一种炎症形式的程序性死亡,即细胞焦亡。焦亡分为 2 条途径:经典焦亡途径与非经典焦亡途径,而细胞内的 LPS 或革兰阴性菌诱导的 Kupffer 细胞焦亡属于非经典焦亡途径。以往的研究者不清楚 caspase-11(在人类细胞中则为 caspase-4/5)的下游关键分子机制,以至于无法很好解释 LPS 介导的 Kupffer 细胞死亡。KAYAGAKI 等<sup>[15]</sup>和 SHI 等<sup>[16]</sup>通过不同的方法找到了焦亡下游的关键分子 Gasdermin D(GSDMD)。KAYAGAKI 等<sup>[15]</sup>通过小鼠基因的大量变异去筛选与 caspase-11 介导的焦亡相关的基因;SHI 等<sup>[16]</sup>通过基因编辑技术找到了 caspase-1 和 caspase-11 介导的焦亡下游的共同分子。他们发现,被激活的 caspase-11 会去切割这个分子,从而使该分子的 N 端从自我抑制的 C 端中释放出来,释放出的 N 端是细胞发生焦亡的关键。随后,DING 等<sup>[17]</sup>又说明了 N 端导致细胞死亡的原因<sup>[17]</sup>,他们发现被切割下来的 N 端可以结合脂质膜并能在细胞膜上形成由 16 个单元围成的直径约为 10~14 nm 的孔洞,因渗透压的作用而引起细胞肿胀死亡。除 GSDMD 介导的焦亡外,YANG 等<sup>[13]</sup>发现,pannexin-1 和 P2X7 对于 Kupffer 细胞的焦亡也至关重要,因为在缺乏这两个蛋白时细胞内的 LPS 诱导的细胞焦亡程度会减弱,并且野生型小鼠相较于这两个基因被敲除后的小鼠更容易在 LPS 的刺激下死亡,机制上解释为,激活的 caspase-11 切割 pannexin-1 使 ATP 释放,ATP 的释放作用于细胞膜上的 P2X7,从而使非选择性阳离子通道开放,诱发细胞焦亡。

细胞焦亡作为一种炎症形式细胞死亡的方式,可以通过杀灭感染细胞及释放炎症因子两个手段达到使感染局限以抵抗感染的作用,除此之外,通过细胞内 LPS 激活非经典 NLRP3 炎症小体通路也能使炎症因子的释放增多。现在认为焦亡主要发生在一些具有吞噬功能的细胞中,比如 Kupffer 细胞、树突状细胞、内皮细胞等<sup>[18]</sup>,而 Kupffer 细胞作为人体巨噬细胞中最大的一个群体,专门针对 Kupffer 细胞的焦亡

或是炎症小体通路的研究却相对较少。因此,若进一步理解焦亡和炎症小体在 Kupffer 细胞中的作用,可能会为感染相关的疾病如脓毒血症、内毒素休克等提供新的治疗靶点。

## 3 Kupffer 细胞内毒素耐受机制的研究进展

### 3.1 内毒素耐受概念及 TLRs 通路上的负性调控因子

内毒素耐受指的是,当预先给予小剂量的 LPS 刺激之后,在随后的大剂量 LPS 作用下,机体会表现出较低的炎性反应或是不表现出炎性反应的现象。这种现象与许多脓毒血症患者感染的后期发生免疫麻痹在原理上有许多的相似之处。肝脏长期暴露在来源于肠道微生物刺激的环境下,却不表现明显炎症,其中,Kupffer 细胞的内毒素耐受发挥着至关重要的作用。内毒素耐受时可以发生 TLRs 受体的下调、信号分子的改变、转录因子的负性调控及染色质的组蛋白修饰<sup>[19]</sup>等。在 TLR4 信号通路的各个环节上,内毒素耐受会使 TLR4 表达下调、TLR4 对 MYD88 及 TRIF 招募的降低、IRAK1/4 的活性降低及通过形成无活性的 p50 二聚体影响 NF- $\kappa$ B 活性<sup>[20-21]</sup>。除此之外,还包括一些作用于此条通路中负性调节因子的上调,现已被证实的包括 Pellinon3 负性调控 TLR4/TLR2 信号通路、IRAK-M 抑制 IRAK1/IRAK4 激酶、SHIP1 抑制 JNK 和 p38 磷酸化从而抑制 MAPK 信号通路、SCOS1 负调控 TLR4/MYD88 通路、Twist-2 阻断 NF- $\kappa$ B 促炎症转录等<sup>[22-26]</sup>。

### 3.2 TRAF3 的泛素化修饰在 Kupffer 细胞内毒素耐受中的作用

TRAF3 为肿瘤坏死因子受体家族成员之一,其生物学功能依赖于它的 K48 泛素化降解及 K63 自身泛素化激活,由于它在内毒素耐受中可以影响 JNK/p38 MAPK 通路及 TRIF 通路<sup>[27]</sup>,因此对于 TRAF3 泛素化修饰在内毒素耐受中相关的研究近年来有不少的报道。LI 等<sup>[28]</sup>发现,内毒素耐受时 MAPK 通路发生了重编程,机制上是通过 Pellinon1 介导的 cIAP2 的 K63 泛素化抑制及 TRAF3 的 K48 泛素化降解的抑制来实现,并且还在胆管炎患者体内也验证了 Pellinon1 的上调及 TRAF3 的下调的现象。同一个团队中的 WEN 等<sup>[29]</sup>也发现了在 Kupffer 细胞内毒素耐受时 USP25 这种专门针对 TRAF3 的去泛素化酶表达会出现上调,然后通过抑制 TRAF3 的 K48 泛素化连接从而抑制其降解,最终抑制 MAPK 通路实现内毒素耐受。

### 3.3 非编码 RNA 对 TLRs 信号通路的调控在 Kupffer 细胞内毒素耐受中的作用

#### 3.3.1 微 RNA(microRNA,miRNA)对 Kupffer 细胞内毒素耐受的调控

miRNA 为一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小 RNA,可以与 mRNA 非翻译区的 3'端的多个位点结合,起到对 mRNA 转录后的负性调控作用。近年来,研究者发现 miRNA 对于 TLRs 信号通路的调控在内毒素耐受中十分重要。如 miR-