

LPS 的胞内受体 Caspase-11 的研究进展*

罗炳生 刘靖华**

(南方医科大学基础医学院, 广东省功能蛋白质组学重点实验室, 广州 510515)

摘要 以往的研究认为, TLR4 是内毒素(LPS)的胞膜受体. 新近的研究发现含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 11 (Caspase-11, Casp11)可能在胞内 LPS 的识别中发挥关键作用. Caspase-11 与胞内 LPS 结合后被激活. 活化的 Casp-11 一方面剪切下游 gasdermin D 分子进而介导细胞焦亡(pyroptosis), 另一方面激活 NLRP3/ASC-Casp-1 通路, 使细胞分泌促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 等. Casp-11 还能通过促进吞噬体和溶酶体融合, 增强细胞对革兰氏阴性菌的杀灭. 在严重内毒素血症过程中, 由于 Casp-11 过度活化, 大量细胞发生焦亡, 致使大量胞内促炎介质被释放到胞外, 导致机体出现难以调控的炎症反应, 最终发展成内毒素休克. Casp-11 是内毒素休克发生的关键分子. 本文对 Casp-11 在 LPS 的识别、活化及效应方面的最新进展进行综述.

关键词 Caspase-11, LPS, 革兰氏阴性菌, 内毒素休克, 细菌清除

学科分类号 Q26

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0235

内毒素(endotoxin), 又称为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 是革兰氏阴性菌细胞外壁的成分, 在启动体内免疫系统反应, 导致内毒素休克的过程中具有重要的作用. 以往的研究认为, 在 LPS 激活或启动机体免疫系统的过程中, 首先是 LPS 被病原体相关分子模式受体(pattern recognition receptor)TLR4 识别, 并激活细胞内信号转导通路, 继而产生炎症介质如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6^[1-2]等. 如果调节适度, 这些反应就形成宿主对病原微生物的有效防御. 但如果反应过度, 则会导致大量促炎细胞因子释放入血, 形成失控的炎症反应, 最终导致内毒素血症的发生, 严重时可发生休克、多器官功能障碍, 甚至死亡^[3-4]. 近年来, 一种称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 11 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase-11, Casp-11)的发现, 使我们不得不重新思考和认识机体如何识别 LPS 并对其产生反应. Casp-11 与 Casp-1 同源(46%同源性), 前者最早是由 Yuan 等^[5-6]在研究线虫时发现的一个由 *ced-3* 编码的、可介导细胞程序性死亡的新的 Caspase 家族蛋白 Ich-3. 在人类, 与 Casp-11 同源的是 Casp-4 和 Casp-5^[7]. 尽管活化的 Casp-11 与 Casp-1 一样均能介导细胞

焦亡和分泌成熟的 IL-1 β 和 IL-18, 但是二者在活化途径上以及活化后发挥的生物学效应等有显著不同. 例如, Casp-11 是 LPS 的胞浆内受体, 其激活需要胞浆内 LPS 的存在, Casp-11 主要对进入胞内的革兰氏阴性菌有清除作用, 而且与内毒素休克的发生发展密切相关等等. 那么, Casp-11 是如何被活化的, 其活化后有什么生物学效应? Casp-11 在内毒素休克发生发展中的地位如何? 本文就相关研究的最新进展进行综述.

1 Casp-11 的表达及活化

Casp-11 也有前体(Pro-casp-11)及活化(active Casp-11)两种形式. 研究表明, Casp-11 前体的表达与活化受到不同信号机制的调控, 前者与 TLR 受体介导的信号通路激活有关, 而后者与胞浆内的 LPS 刺激有关.

* 国家自然科学基金资助项目(81471901, 81072425)和广东省自然科学基金重点项目(2015A030311031).

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648172-810, E-mail: liujhua@fimmu.com

收稿日期: 2017-06-21, 接受日期: 2017-12-18

1.1 Casp-11 的表达

巨噬细胞在生理状态下只表达少量的 Casp-11, 当给予 TLR4 激动剂如 LPS、或者 TLR3 激动剂 Poly(I:C)、或者 TLR2 激动剂 Pam3CSK4、或者干扰素 IFN β 或 IFN γ 刺激后, 均可检测到 Casp-11 表达量的增加^[8-13]. 研究还发现, 用霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、鞭毛缺失的肠炎血清型鼠伤寒沙门氏菌(*Flagellin-deficient Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Δ Flag *S. typhimurium*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, *L. pneumophila*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、肠出血性大肠杆菌(*enterohemorrhagic E. coli*, EHEC)以及柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*, *C. rodentium*)等胞壁含 LPS 的革兰氏阴性菌去感染巨噬细胞时, 也能检测到 Casp-11 表达增加, 而给予革兰氏阳性菌刺激时 Casp-11 表达增加不明显^[9, 11-12, 14]. 进一步研究发现, 在 Casp-11 基因的 5' 端上游启动子区域有多个 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 结合位点和一个 STAT (signal transducers and activators of transcription) 结合位点. TLRs 被其配体激活后, 经 MyD88 (adapter myeloid differentiation primary response gene 88) 及其下游信号分子活化 NF- κ B, 或者经 TRIF [Toll or Interleukin-1 Receptor (TIR)-domain-containing adapter-inducing interferon- β]-IRF3/7 (interferon transcription factors)-type IFN-IFNR-STAT1 通路活化 STAT1^[15]. 活化的 NF- κ B 和 STAT1 进入核内与 Casp-11 基因上游的启动子结合, 使 Casp-11 转录增加^[15]. 如 TLR2 受体激动剂 Pam3CSK4 通过活化 NF- κ B 通路增强 Casp-11 转录^[11]; TLR3 受体激动剂 Poly(I:C) 通过 TRIF 和其下游的 IRF3/7 分子使细胞 I 型干扰素 IFN- α 和 IFN- β 转录后, 再经过 IFNR-STAT1 通路促进 Casp-11 转录^[12]; TLR4 激动剂 LPS 则通过 MyD88 或 TRIF 通路加强 Casp-11 转录^[15]. 此外, 直接给 IFN- β 和 IFN- γ 刺激同样可使巨噬细胞 Casp-11 转录增强^[15]. 虽然 Pam3CSK4、Poly(I:C)、IFNs 或 LPS 能使 Casp-11 表达上调, 但是它们都不能使 Casp-11 活化. 那么, Casp-11 是如何被活化的呢?

1.2 胞浆内 LPS 是活化 Casp-11 的关键分子

Kayagaki 等^[11]发现革兰氏阴性菌如 *E. coli*、*C. rodentium*、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*) 和福氏志贺菌 (*Shigella flexneri*) 均能引起 Casp-11 介导的细胞焦亡的发生, 并且 Casp-11 对细胞内从囊泡里逃逸出来的革兰氏

阴性菌有清除作用^[16]. 上述研究提示 Casp-11 可以被革兰氏阴性菌的某些成分直接活化. 研究人员推测这些种类各异的革兰氏阴性菌可能是通过其共有的病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) LPS 引起 Casp-11 的活化. 为了避免 TLR4 与 LPS 相互作用的干扰, Kayagaki 等^[13]和 Hagar 等^[17]分别用经 TLR2 激动剂 Pam3CSK4 或 TLR3 激动剂 Poly(I:C) 预处理过的巨噬细胞, 使其表达足够的 Casp-11 前体后, 再通过电穿孔或脂质体的办法把 LPS 转染到胞质后发现, 这种直接转染 LPS 到胞浆内的办法可以引起 Casp-11 活化. 两个独立研究的结果提示 Casp-11 可能是胞内 LPS 的受体.

Kayagaki 等^[13]将 *E. coli* 或 *S. typhimurium* 的 LPS 成分或人工合成的 Lipid A, 分别转染入胞后, 发现它们都可激活 Casp-11. 而当他们将幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和山羊豆根瘤菌 (*Rhizobium galegae*) (它们 LPS 上的 Lipid A 为四酰基-Lipid A) 上的 LPS 转染到胞内时, 却没有观察到 Casp-11 的活化. 这个结果说明并非所有的 LPS 都能激活 Casp-11.

为了进一步证实进入到胞质的 LPS 可活化 Casp-11, Hagar 等^[17]用单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*) 在体外与 LPS 融合后再去感染巨噬细胞. *L. monocytogenes* 是一种革兰氏阳性菌, 能利用其穿孔毒素溶解溶酶体膜逃到胞质. 当用融合了 LPS 的 *L. monocytogenes* 去感染细胞时, 发现巨噬细胞发生了依赖 Casp-11 的细胞焦亡 (单用 *L. monocytogenes* 无法活化 Casp-11). 这个结果进一步证实了 LPS 入胞可引起 Casp-11 活化. 而他们会对胞壁 LPS 进行结构修饰的弗朗西斯菌 (*Francisella novicida*) (将 LPS 上的五酰基-Lipid A 修饰为四酰基-Lipid A) 和鼠疫耶尔森氏杆菌 (*Yersinia pestis*) (将 LPS 上的六酰基-Lipid A 修饰为四酰基-Lipid A) 去感染巨噬细胞却没检测到 Casp-11 的活化. 这个研究说明细菌可通过修饰 LPS 上的脂质 A 结构从而避免引起 Casp-11 活化进而逃避被清除的危险.

那么革兰氏阴性菌的 LPS 如何进入到胞浆内被 Casp-11 识别? Vanaja 等^[18-19]认为, 细菌可能通过自身形成含有高浓度 LPS 的外膜囊泡, 经巨噬细胞内的网格蛋白 (clathrin) 介导内吞形成吞噬体进入胞质后, 再由鸟苷酸结合蛋白 (guanylate binding proteins, Gbp) 破坏囊泡, 将 LPS 暴露在胞浆内被

Casp-11 识别. 而 Kopp 等^[20]提出, LPS 结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 可能会在转导 LPS 入胞中起到作用, 而且并不依赖于 TLR4/MD-2. 之前的研究认为, LBP 的最重要的作用是结合 LPS 形成水溶的 LPS-LBP 复合物, 转运至胞膜上与 TLR4/MD-2 形成复合体, 进而引起炎症反应. 基于 LBP 的转运特性, Kopp 等推测 LBP 在转导 LPS 入胞中可能发挥了作用. 他们通过荧光猝灭实验和激光共聚焦显微镜观察到当胞外 LPS 浓度升高时, LBP 会结合更多的 LPS, 同时胞浆内的 LBP-LPS 数量大大增加. 但是 LBP 通过何种具体的机制转导 LPS 进入细胞, 目前尚不清楚.

1.3 胞浆内 LPS 是活化 Casp-11 的关键分子

虽然上述研究证明了 LPS 是活化 Casp-11 的关键分子, 但是, Casp-11 能否直接识别 LPS 并不清楚. Shi 等^[21]发现 Casp-11(-4、-5)可能是通过自身

的 CARD(caspase-activation and recruitment domain) 结构域直接识别 LPS, 再经寡聚后活化. 证据有以下几个方面: a. 用生物素标记的 LPS 可成功地把 Casp-11 沉淀下来; b. 通过基因重组的方法将 Casp-11 上 CARD 结构域与 Casp-1 形成嵌合体后, 再把 LPS 转染进 Casp-11^{-/-} 巨噬细胞后发现, 这种嵌合的 Casp-1 依旧能介导细胞发生焦亡, 而且嵌合体同样可被 LPS 沉淀; c. 将只表达 Casp-11 CARD 肽段的细胞裂解后加入 LPS, 发现 CARD 肽段被沉淀下来, 而且发生了寡聚化; d. 将 CARD 上的 3 个保守位点突变掉后, LPS 无法沉淀这种 CARD 肽段, 而且用电转染 LPS 入胞的方法也无法观察到 Casp-11 介导的细胞焦亡发生. 这些结果提示 Casp-11 上的 CARD 结构域可能为识别 LPS 的位点, 与 LPS 结合后的多个 CARD 肽段进而寡聚化, 形成活化形式的 Casp-11(图 1).

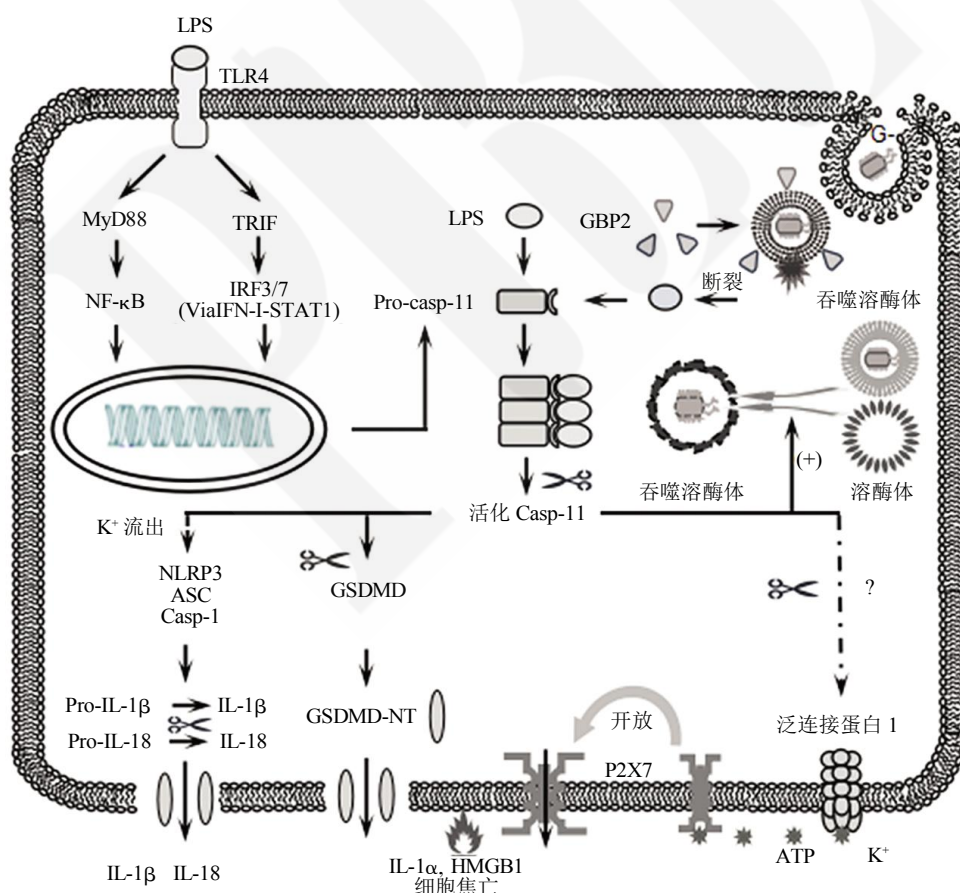


Fig. 1 Activation pathway and effect of Casp-11

图 1 Casp-11 的活化通路及其活化效应

胞外 LPS 与胞膜上 TLR4 相互作用后, 激活 MyD88-NF-κB 或 TRIF-IRF3/7-IFN-I-IFNR-STAT1 信号通路, 增强 Pro-casp-11 的转录和表达. Pro-casp-11 与胞浆内的 LPS 结合, 聚合并形成活化的 Casp-11. Casp-11 活化后产生两种效应: a. 诱导细胞发生焦亡. 一种途径是 Casp-11 剪切 GSDMD 形成 GSDMD-NT, 多个 GSDMD-NT 在胞膜上聚合成孔道; 另一种途径是 Casp-11 剪切泛连接蛋白 1 (pannexin-1), 使 Pannexin-1 通道开放, ATP 外流, 激活 P2X7, 使 P2X7 通道开放. b. 激活 NLRP3/ASC-Casp-1 通路, 使细胞分泌 IL-1β 和 IL-18. 活化后的 Casp-11 还可促进溶酶体与含 G 菌的吞噬体融合, 杀灭细菌, Gbp2 与吞噬体结合后, 吞噬体膜破裂, 细菌胞壁上的 LPS 暴露在胞质中, Casp-11 被激活.

2 Casp-11 活化后的生物学效应

Casp-11 通过 CARD 结构域识别细菌胞壁上的 LPS 后寡聚化形成复合体后被活化, 其活化后的生物学效应是什么呢? 目前已知, Casp-11 活化后主要有两方面的作用:

一方面, 活化的 Casp-11 诱导细胞发生焦亡, 同时分泌 IL-1 α 、HMGB1. 近年来, Kayagaki 等^[22]和 Shi 等^[23]分别发现, 细胞焦亡的发生是由 Casp-11 剪切 Gasdermin D (GSDMD) 羧基端 (GSDMD-CT) 后形成 30 ku 的氨基端 (GSDMD-NT) 活性片段介导的. 多个 GSDMD-NT 片段寡聚化后迁移至胞膜, 与胞膜脂质的分子如心磷脂, 磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇结合, 在胞膜上形成 15 nm 内径和 32 nm 外径的稳定环形孔道^[24-25]. 由于胞膜上孔道的形成, 胞膜的选择性透过作用下降, 大量胞外液体与胞浆内容物相互沟通, 在胞膜面形成大量类似凋亡小体样的焦亡小体, 最终导致细胞死亡^[25]. 而与 Kayagaki 等和 Shi 等发现 GSDMD 是介导细胞发生焦亡的关键分子不同, Yang 等^[26]提出另一种由 Casp-11 介导的细胞焦亡的方式. 他们的研究认为, 胞内 LPS 活化后的 Casp-11 剪切胞膜上的泛连接蛋白 (pannexin-1) 通道, 使 pannexin-1 通道开放, 进而引起 ATP 和 K⁺ 外流. 释放到胞外的 ATP 与胞膜表面的 P2X7 (ATP-sensitive purinergic receptor) 受体相互作用后, P2X7 的离子通道开放, 在胞膜表面形成孔道, 使细胞发生焦亡 (图 1). 那么, 这两种介导细胞发生焦亡通路是否存在共同的上游或下游通路? 亦或是否存在某种联系从而一起介导细胞发生焦亡? 相关问题有待进一步的研究来阐明.

另一方面, 活化的 Casp-11 激活 NLRP3/ASC-Casp-1 通路, 使细胞分泌促炎因子 IL-1 β 和 IL-18^[11] (图 1). 最近人们对于 Casp-11 是如何激活 NLRP3 有了新的认识. Rühl 和 Broz 在研究中发现, 在对经 PAM3CSK4 预处理后, 再转染 LPS 到巨噬细胞内活化 Casp-11 后, 有大量的 K⁺ 流出胞外. 而当他们用高浓度的 KCl 和 NaCl 作为培养液再去观察时, 则发现 IL-1 β 的释放显著减少, 而且与 KCl 溶液呈剂量依赖关系, K⁺ 浓度越高, IL-1 β 释放越少^[27]. 与之前 Munoz-Planillo 等的研究发现 K⁺ 外流为 NLRP3 活化的关键因素一致^[28]. 这两个研究结果说明, 活化后的 Casp-11 很可能是通过影响 K⁺ 的外流, 进而激活 NLRP3/ASC-Casp-1 通路

分泌 IL-1 β 和 IL-18. 那么 K⁺ 是如何流出胞外, 进而激活 NLRP3/ASC-Casp-1 通路呢? Yang 等^[26]的研究推测, 活化后的 Casp-11 作用于 Pannexin-1 通道, 使其开放, 进而外释 K⁺. 当他们用 CBX、丙磺舒 (probenecid) 和 曲伐沙星 (travofloxacin) 对 Pannexin-1 通道进行阻滞时, K⁺ 外释显著减少, 同时 IL-1 β 的释放亦减少. 此外, Py 等^[29]的研究提出 Casp-11 通过降解瞬时受体电位通道 1 (transient receptor potential channel 1, TRPC1) 可影响 IL-1 β 的释放, 当 TRPC1 降解时, IL-1 β 分泌增加. 另外, He 等^[30]在对 GSDMD 引起细胞焦亡的研究中发现 IL-1 β 分泌可能依赖于 GSDMD 分子. 被剪切后的 IL-1 β 的直径大约为 4.5 nm, 是很容易从 GSDMD 在膜上形成的 15 nm 内径和 32 nm 外径的稳定环形孔道被动地流出胞外^[24].

3 Casp-11 在清除细菌方面的作用

Casp-11 清除细菌的作用主要体现在以下两个方面. 第一, 促进吞噬体与溶酶体融合, 增强细胞对细菌的杀灭; 第二, 促进逃逸吞噬体包裹进入胞质的革兰氏阴性菌的清除.

3.1 Casp-11 促进吞噬体与溶酶体融合

巨噬细胞识别胞外的革兰氏阴性菌后, 通过胞吞作用形成吞噬体把细菌吞入到胞内与溶酶体融合形成吞噬溶酶体后杀灭细菌. 研究者发现 Casp-11 在这个过程中可能通过促进吞噬体与溶酶体融合, 增强细胞对细菌的杀灭.

Akhter 等^[31]用融合了绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的 *L. pneumophila* 分别去感染野生型 (wild type, WT) 的巨噬细胞和 Casp-11^{-/-} 巨噬细胞, 发现后者胞内的荧光量远比与前者多, 提示 Casp-11^{-/-} 巨噬细胞杀菌能力下降, 进一步, 用透射电镜观察两种细胞中细菌的数量和形态发现, Casp-11^{-/-} 巨噬细胞胞内菌量明显多于 WT 型巨噬细胞, 而且细菌降解程度 (从细菌的不规则边缘判断) 更低. 这些结果说明 Casp-11 对限制 *L. pneumophila* 在胞内的生长有一定作用. 此外, 他们用 *L. pneumophila* 分别感染 Casp-11^{-/-} 鼠和 WT 鼠后发现, 前者肺组织的菌量明显多于后者^[31]. 但是, Casp-11 是通过哪种方式来限制 *L. pneumophila* 在胞内的生长繁殖的呢? 之前有研究发现 Casp-11 对于骨架蛋白的功能有一定影响. 那么, Casp-11 是否有可能通过影响包含 *L. pneumophila* 的吞噬体与溶酶体融合进而影响细菌的降解呢? Akhter 等^[31]

沿着这一思路, 用溶酶体红色荧光探针标记溶酶体, 去确定含 *L. pneumophila* 的吞噬体与标记的溶酶体融合的发生率. 他们的结果显示, WT 型巨噬细胞中, 大约 55%~65% 的吞噬体与溶酶体发生了融合, 而 Casp-11^{-/-} 巨噬细胞中则只有 40% 融合. 这个结果提示 Casp-11 在介导吞噬体与溶酶体融合中发挥了作用(图 1). 进一步, 他们把含有活化形式的 Casp-11 的质粒导入 Casp-11^{-/-} 巨噬细胞, 发现吞噬体与溶酶体融合的比率提高, 进一步验证了这个结果^[31]. 接下来, Akhter 等进一步研究了 Casp-11 是否通过影响丝切蛋白(cofilin)的磷酸化和去磷酸化介导肌动蛋白(actin)的聚合和解聚合, 进而调节吞噬体和溶酶体的融合. 研究发现, 野生型巨噬细胞在未经感染时, cofilin 处于磷酸化状态, 当受到 *L. pneumophila* 感染时, cofilin 逐渐去磷酸化. 而在 Casp-11^{-/-} 的巨噬细胞中, 无论有无 *L. pneumophila* 感染, cofilin 都是处于去磷酸化状态, 也就是说无法调节环状肌动蛋白的聚合和解聚合, 进而使吞噬体与溶酶体融合^[31]. 这个结果提示, Casp-11 可能通过影响 Cofilin 的磷酸化和去磷酸化进而影响肌动蛋白的聚合与解聚, 从而调节吞噬体与溶酶体的融合, 进而杀灭 *L. pneumophila*.

最近, Caution 等^[32]发现, 含 *L. pneumophila* 的吞噬体与溶酶体的融合需要 Casp-11 和 Casp-1 的共同参与. Casp-11 通过 Ras 家族中的成员蛋白 A, 一个鸟苷三磷酸酶(Ras homolog gene family, member A GTPase, RhoA GTPase)来介导 cofilin 的磷酸化, 而 Casp-1 则通过 Slingshot 磷酸酶(Slingshot phosphatase)使 cofilin 去磷酸化, 进而介导激动代表的聚合和解聚, 从而促进吞噬体与溶酶体的融合.

然而, 这两个研究都是针对 *L. pneumophila* 进行的研究, 对于其他的革兰氏阴性菌, Casp-11 是否同样可以通过介导 cofilin 的磷酸化影响吞噬体与溶酶体融合进而促进杀灭细菌, 目前尚不清楚, 还有待进一步的研究明确.

3.2 Casp-11 对逃逸出吞噬囊泡的细菌的作用

在吞噬体与溶酶体融合杀灭病原体的过程中, 有的细菌逃逸出吞噬体, 进入胞浆内进行复制, 如泰国伯克霍尔德杆菌(*Burkholderia thailandensis*)和伯氏假单胞菌(*Burkholderia pseudomallei*); 而另一些细菌如 *S. typhimurium* 和 *L. pneumophila* 则能够抑制吞噬体与溶酶体融合, 在吞噬体内进行大量繁殖^[33-34]. 对于进入胞质的细菌, Casp-11 可以发挥

直接的抗菌作用; 对于藏匿于囊泡的细菌, 则需要溶解囊泡膜后将细菌暴露, 再经 Casp-11 介导的焦亡过程清除^[35].

Aachoui 等^[16]的研究提示 Casp-11 可能与入侵到胞浆内的革兰氏阴性菌的杀灭和清除有关. 他们用在胞浆内生长繁殖的 *Burkholderia thailandensis* 和 *Burkholderia pseudomallei* 去感染 Casp-11^{-/-} 和 WT 对照小鼠发现, 前者容易被这两种菌感染并死亡, 而后者则不会. *S. typhimurium* 和 *L. pneumophila* 被巨噬细胞吞噬后形成吞噬体进入胞质后, 分别通过其伤寒沙门氏菌致病岛 2 (Salmonella pathogenicity island 2, SPI2) 的 III 型分泌系统(Type III secretion system, T3SS) 和 *L. pneumophila* 的 IV 型分泌系统(T4SS)去维持吞噬体膜的稳定性以及抑制与溶酶体的融合, 同时减少鞭毛的表达, 使得其能够在巨噬细胞内利用吞噬体进行大量繁殖^[33-34].

S. Typhimurium 的 SPI2 T3SS 分泌系统表达 SifA 分子(其作用为维持吞噬体膜的稳定). Aachoui 等用敲除了 SifA 分子的 *S. typhimurium* 去感染巨噬细胞时发现, 含菌的吞噬体泡膜破裂, 此时暴露在胞浆内的细菌可以被 Casp-11 介导的焦亡过程清除^[16,33]. 类似的, *L. pneumophila* 的 T4SS 表达 SdhA 分子和鞭毛(flagellin, flaA), 用突变了鞭毛(Δ flaA)和 Δ sdhA 的 *L. pneumophila* 去感染用短发夹 RNA 敲掉 NLRC4 和 ASC 的巨噬细胞中发现, 暴露在胞质中的 *L. pneumophila* 的清除也是与 Casp-11 有关^[16]. 此外, 体内的实验也表明, 在 Δ SifA *S. typhimurium* 感染时, WT 鼠比 Casp-11^{-/-} 鼠能清除更多的细菌^[16]. 这些结果说明, Casp-11 参与了胞浆内的细菌的清除.

然而藏匿在吞噬体内的细菌又是如何被清除的呢? Meunier 等^[35]提出, Gbp, 特别是 Gbp2, 一种由干扰素(interferon, IFN)诱导产生的 GTP 酶, 其基因位于小鼠的第三条染色体, 在破坏细菌逃避机体的识别和进行繁殖的吞噬体膜稳定性中起着重要的作用. 他们把 Gbp 基因从鼠第三条染色体上敲除后, 分别用革兰氏阴性菌如 *S. typhimurium*、*Vibrio cholerae*、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)和克氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*)去感染经 LPS 或 poly(I:C)预处理后的 Gbp2^{-/-} 巨噬细胞和 WT 型巨噬细胞发现, 前者死亡的数量和 IL-1 β 分泌量都远比 WT 型巨噬细胞少, 同时胞内细菌荷载大大增加^[35]. 这些结果提示在 Gbp2^{-/-} 巨噬细胞中, 细菌将继续藏匿于吞噬体内, 不会进入到胞质中, 进而避

免 Casp-11 活化后引起的杀菌效应. 为了进一步证明 Gbp2 有溶解吞噬体膜作用, Meunier 等^[35]用荧光标记的 *S. typhimurium* 分别感染 Gbp2^{-/-} 和 WT 型巨噬细胞后发现, 前者胞浆内荧光量显著低于后者. 而当用荧光标记的 *Shigella flexneri* (一种利用其 T3SS 溶解溶酶体膜, 进而逃逸到胞质的细菌) 则发现两种细胞胞浆内的荧光量并无显著差异. 这两个实验共同说明了机体很可能通过 Gbp2 去主动溶解吞噬体膜, 进而把藏在吞噬体的细菌暴露, 从而活化 Casp11, 以达到杀灭细菌的目的 (图 1). 但是, 目前还不清楚 Gbp2 是通过何种机制去溶解含 *S. typhimurium* 的吞噬体膜. 最近, Man 等^[36]提出干扰素诱导蛋白 (interferon response gene B10, IRGB10), 可能与 Gbp2 组合后破坏细菌囊泡膜. 相关研究为进一步明确 Gbp2 的作用机制提供了重要线索.

4 Casp-11 在清除细菌方面的作用

虽然 Casp-11 在识别及清除胞内革兰氏阴性菌方面发挥了重要作用, 但是 Casp-11 过度活化则可能加剧炎症反应, 导致脓毒性休克的发生. 有研究者用非致死剂量的 TLR3 激动剂 poly(I:C) 分别去预处理 TLR4^{-/-}、WT 型和 Casp-11^{-/-} 小鼠后再注射致死剂量的 LPS 时发现, 前两种鼠都因内毒素休克死亡, 而 Casp-11^{-/-} 鼠存活^[13, 17]. 这些实验结果说明 TLR4 很可能只是 Casp-11 前体表达所必需的, 而 Casp-11 也许才是真正导致小鼠发生内毒素休克的关键分子. 究其原因可能与大剂量 LPS 造成 Casp-11 过度活化, 进而引起大量细胞焦亡, 焦亡的细胞内容物如 HMGB1、IL-1 β 、IL-1 α 等炎症介质从胞内流出到胞外, 趋化大量炎症细胞如中性粒细胞到达损伤局部, 进一步放大炎症反应, 最终引起内毒素休克而导致动物死亡有关^[11, 13, 17]. 此外, 在补体方面, Cpb1-C3-C3aR 轴在诱导 Casp-11 表达, 进而介导内毒素休克发生也起到一定的作用^[37]. 在临床应用上, 我们也许可以开发出针对 Casp-11 的靶向药物, 从而避免炎症反应过度激活而导致的内毒素休克的发生.

5 展 望

近年来, 科学家们除了发现 Casp-11 为 LPS 的胞内受体、TLR4 很可能只是作为 Casp-11 表达所必需的, 而并非是 LPS 引起内毒素休克的关键分子外, 还发现 GSDMD 是 Casp-11 介导细胞焦亡的

关键分子以及 Casp-11 对细菌有促进清除的作用等等. 然而, 我们仍然不清楚 LPS 与 CARD 结构域结合后, Casp-11 是如何被剪切进而活化的? Casp-11 是如何促进胞内细菌的清除? 对于这些问题的研究, 不仅有助于防止内毒素休克的发生, 而且可为开发有效的防治脓毒性休克的药物提供新的思路和靶标.

参 考 文 献

- [1] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, **124**(4): 783–801
- [2] Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998, **282**(5396): 2085–2088
- [3] van der Poll T, Opal S M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*, 2008, **8**(1): 32–43
- [4] Wenzel R P. Treating sepsis. *N Engl J Med*, 2002, **347**(13): 966–967
- [5] Wang S, Miura M, Jung Y, *et al.* Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1 β converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J Biol Chem*, 1996, **271**(34): 20580–20587
- [6] Yuan J, Shaham S, Ledoux S, *et al.* The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 1993, **75**(4): 641–652
- [7] Lin X Y, Choi M S, Porter A G. Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon- γ . *J Biol Chem*, 2000, **275**(51): 39920–39926
- [8] Aachoui Y, Kajiwar Y, Leaf I A, *et al.* Canonical inflammasomes drive IFN- γ to prime Caspase-11 in defense against a cytosol-invasive bacterium. *Cell Host Microbe*, 2015, **18**(3): 320–332
- [9] Broz P, Ruby T, Belhocine K, *et al.* Caspase-11 increases susceptibility to *Salmonella* infection in the absence of caspase-1. *Nature*, 2012, **490**(7419): 288–291
- [10] Gurung P, Malireddi R K, Anand P K, *et al.* Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon- β (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates Toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. *J Biol Chem*, 2012, **287**(41): 34474–34483
- [11] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 2011, **479**(7371): 117–121
- [12] Rathinam V A, Vanaja S K, Waggoner L, *et al.* TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell*, 2012, **150**(3): 606–619
- [13] Kayagaki N, Wong M T, Stowe I B, *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, 2013, **341**(6151): 1246–1249

- [14] Case C L, Kohler L J, Lima J B, *et al.* Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(5): 1851–1856
- [15] Schaulvliege R, Vanrobaeys J, Schotte P, *et al.* Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-gamma requires nuclear factor-kappa B and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1. *J Biol Chem*, 2002, **277** (44): 41624–41630
- [16] Aachoui Y, Leaf I A, Hagar J A, *et al.* Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. *Science*, 2013, **339** (6122): 975–978
- [17] Hagar J A, Powell D A, Aachoui Y, *et al.* Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, 2013, **341**(6151): 1250–1253
- [18] Vanaja S K, Russo A J, Behl B, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and Caspase-11 activation. *Cell*, 2016, **165**(5): 1106–1119
- [19] Finethy R, Luoma S, Orench-Rivera N, *et al.* Inflammasome activation by bacterial outer membrane vesicles requires guanylate binding proteins. *MBio*, 2017, **8**: e01188-17
- [20] Kopp F, Kupsch S, Schromm A B. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: Implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1863**(4): 660–672
- [21] Shi J, Zhao Y, Wang Y, *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 2014, **514**(7521): 187–192
- [22] Kayagaki N, Stowe I B, Lee B L, *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 2015, **526**(7575): 666–671
- [23] Shi J, Zhao Y, Wang K, *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015, **526**(7575): 660–665
- [24] Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 2016, **535**(7610): 153–158
- [25] Chen X, He W T, Hu L, *et al.* Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res*, 2016, **26**(9): 1007–1020
- [26] Yang D, He Y, Munoz-Planillo R, *et al.* Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. *Immunity*, 2015, **43**(5): 923–932
- [27] Rühl S, Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. *Eur J Immunol*, 2015, **45**(10): 2927–2936
- [28] Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, *et al.* K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 2013, **38** (6): 1142–1153
- [29] Py B F, Jin M, Desai B N, *et al.* Caspase-11 controls interleukin-1beta release through degradation of TRPC1. *Cell Rep*, 2014, **6**(6): 1122–1128
- [30] He W T, Wan H, Hu L, *et al.* Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res*, 2015, **25**(12): 1285–1298
- [31] Akhter A, Caution K, Abu K A, *et al.* Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity*, 2012, **37**(1): 35–47
- [32] Caution K, Gavrillin M A, Tazi M, *et al.* Caspase-11 and caspase-1 differentially modulate actin polymerization via RhoA and Slingshot proteins to promote bacterial clearance. *Sci Rep*, 2015, **5**: 18479(DOI: 10.1038/srep184379)
- [33] Ge J, Shao F. Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defence by *Legionella* Dot/Icm effectors. *Cell Microbiol*, 2011, **13**(12): 1870–1880
- [34] Beuzon C R, Meresse S, Unsworth K E, *et al.* *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J*, 2000, **19**(13): 3235–3249
- [35] Meunier E, Dick M S, Dreier R F, *et al.* Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature*, 2014, **509**(7500): 366–370
- [36] Man S M, Karki R, Sasai M, *et al.* IRGB10 liberates bacterial ligands for sensing by the AIM2 and Caspase-11-NLRP3 inflammasomes. *Cell*, 2016, **167**(2): 382–396
- [37] Napier B A, Brubaker S W, Sweeney T E, *et al.* Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. *J Exp Med*, 2016, **213** (11): 2365–2382

Caspase-11 is a Cytoplasmic Receptor for Identifying LPS*

LUO Bing-Sheng, LIU Jing-Hua**

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Proteomics, Basic Medical College, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Previous studies suggest that TLR4 is the membrane receptor for recognizing LPS. Recent studies have shown that Caspase-11 may play an important role in recognizing cytoplasmic LPS. Upon cytoplasmic LPS binding with Casp-11, Casp-11 activation is observed. Activated Casp-11 directly cleaves gasdermin D, inducing Casp-11-dependent pyroptosis and activates NLRP3/ASC-Casp-1 dependent IL-1 β and IL-18 secretion. Besides, it also increases the elimination of Gram-negative bacteria by promoting the fusion of phagosomes and lysosomes. In the process of severe endotoxemia, due to excessive activation of Casp-11, a large number of cells undergo pyroptosis, which lead to intracellular proinflammatory mediators released, induce an uncontrollable inflammatory response, and ultimately lead to the occurrence of endotoxin shock. Casp-11 is a key molecule in endotoxin shock. In this paper, we review the latest progress of Casp-11 in LPS identification, activation and effect in endotoxin.

Key words Caspase-11, LPS, gram-negative bacteria, endotoxin shock, bacterial clearance

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0235

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(81471901, 81072425) and Guangdong Province Natural Science Foundation(2015A030311031).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-61648172-810, E-mail: liujhua@fimmu.com

Received: June 21, 2017 Accepted: December 18, 2017