

DOI:10.13350/j.cjpb.220725

• 综述 •

## 细胞焦亡与嗜神经病毒感染研究进展\*

李文娟<sup>1</sup>, 张凯<sup>1\*\*</sup>, 王春梅<sup>2\*\*</sup>

(1. 济宁医学院法医学与医学检验学院, 山东济宁 272067; 2. 济宁医学院神经生物学研究所)

**【摘要】** 细胞焦亡是一种伴随炎症反应的细胞程序性死亡方式。相比于细胞凋亡, 细胞焦亡发生的更快, 并会伴随着大量促炎症因子的释放。作为机体的重要免疫防御反应, 细胞焦亡广泛参与感染性疾病、神经系统相关疾病等发生与发展。嗜神经病毒是一类对神经系统高度敏感的病毒, 造成严重的中枢神经系统感染及并发症, 病死率较高, 但目前尚无有效治疗方法, 因而受到广泛关注和研究。本文针对细胞焦亡在嗜神经病毒感染后炎症反应中发挥的作用及其机制进行综述, 以期后续研究深入阐释其具体机制、寻找抗病毒治疗的新靶点提供参考。

**【关键词】** 细胞焦亡; 嗜神经病毒; 神经系统感染; 综述

**【中图分类号】** R37

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2022)07-0857-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jul.;17(7):857-861, 867.]

### Research progress in the role of pyroptosis in neurotropic viruses infection

LI Wen-juan<sup>1</sup>, ZHANG Kai<sup>1</sup>, WANG Chun-mei<sup>2</sup> (1 *School of Forensic and Laboratory Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong, China*; 2 *Neurobiology Key Laboratory of Jining Medical University in Colleges of Shandong*)

**【Abstract】** Pyroptosis is a type of programmed cell death associated with inflammatory response. Pyroptosis, accompanied by release of a large number of pro-inflammatory factors, occurs faster than apoptosis. As an important immune defense response, pyroptosis is widely involved in the pathogenesis of infectious diseases and central nervous system infections. Neurotropic viruses, a group of viruses highly sensitive to the nervous system, could cause severe central nervous system infection and complications, with high mortality and lack of effective treatments yet. So it has been widely concerned and studied. This article reviews the function of pyroptosis in inflammatory response during neurotropic viruses infection, which would be beneficial on development of molecular pathogenesis and potential therapeutic drugs for antiviral infection treatment.

**【Key words】** pyroptosis, neurotropic virus; nervous system infection; review

\*\*\*病毒的生命周期涉及到与宿主代谢机制的复杂相互作用。一些病毒感染可以通过不同的途径触发程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)。病毒感染性疾病的发病机制通常与病毒诱导的细胞死亡和炎症细胞因子的产生有关, 而炎症细胞因子的产生通常与 PCD 有关。PCD 主要包括凋亡(apoptosis)、焦亡(pyroptosis)和坏死(necrosis)。细胞凋亡被认为是一种非溶解性的免疫沉默的细胞死亡形式, 而焦亡和坏死则是伴随着炎症反应的溶解性细胞死亡。细胞焦亡主要通过炎症小体介导多种炎症性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 caspase (caspase-1, caspase-4, caspase-5 和 caspase-11) 的激活, 造成包括焦孔素 D(gasderminD, GSDMD)在内的多种 Gasdermin 家族成员发生剪切和多聚化, 释放的 Gasdermin-N 结构域与质膜中的磷酸肌醇结合并形成膜孔, 造成细胞穿孔, 进而引起细胞死亡等<sup>[1-2]</sup>。相比于细胞凋亡, 细胞焦亡发生的更快, 并会伴随着大量促炎症因子的释放。

作为机体重要天然免疫反应, 细胞焦亡广泛参与感染性疾病、神经系统相关疾病等的发生发展, 对细胞焦亡的深入研究有助于认识其在相关疾病发生发展和转归中的作用, 为临床防治提供新思路。嗜神经病毒是一类对神经系统高度敏感的病毒, 能够突破血脑屏障侵入中枢神经系统(central nervous sys-

tem, CNS)引起脑炎, 造成严重的中枢神经系统感染及其并发症。炎症细胞因子介导的免疫炎症反应在病毒性脑炎的发生和发展过程中发挥重要作用。抑制细胞焦亡的发生则可以在一定程度上减少炎症因子生成, 减轻炎症反应, 降低细胞的损伤程度。对细胞焦亡的深入研究有助于认识其在嗜神经病毒感染等相关疾病发生发展和转归中的作用, 为病毒感染探寻新的药物靶点和新的治疗策略。

### 1 细胞焦亡

**1.1 细胞焦亡的概念** 细胞焦亡是一种近年来新发现的程序性细胞死亡方式。Brennan 等<sup>[3]</sup>发现, 鼠伤寒沙门氏菌通过一种不同于细胞凋亡的促炎机制杀死吞噬细胞。感染鼠沙门氏菌后死亡的巨噬细胞核内出现 DNA 片段化, 并丧失膜的完整性, caspase-1 抑制剂可以阻止受感染的吞噬细胞死亡, 却不能

\* **【基金项目】** 山东省自然科学基金项目 (No. ZR2017LH056, ZR2020MHL136)。

\*\* **【通讯作者】** 王春梅, E-mail: wangchunmei410@mail.jnmc.edu.cn; 张凯, E-mail: jyk4617@163.com

**【作者简介】** 李文娟(1983-), 女, 山东金乡人, 博士, 副教授, 主要从事病毒学检验研究。E-mail: liwenjuan\_sdu@163.com

阻止经诱导的巨噬细胞凋亡,提示这是一种具有 caspase-1 依赖性的与细胞凋亡不同的细胞死亡机制,这种新的细胞死亡方式被正式命名为“pyroptosis”-细胞焦亡<sup>[2-3]</sup>。细胞焦亡是一种与炎症反应相关的程序性死亡方式,细胞在死亡过程中会出现肿胀破裂、炎性因子释放等,继而引发周围组织一系列炎症反应。

**1.2 细胞焦亡的分子机制** 细胞焦亡分为 caspase-1 介导的经典焦亡途径和 caspase-4/5/11 介导的非经典焦亡途径(图 1)。其中,人体内存在 caspase-1、4、5 途径,小鼠体内存在 caspase-1、11 途径<sup>[4]</sup>。

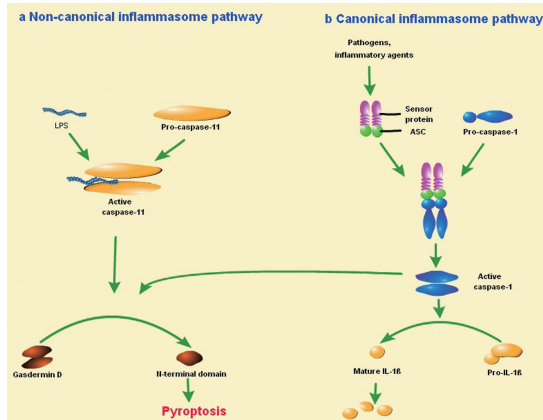


图 1 经典及非经典细胞焦亡途径  
Fig. 1 The classical and non-classical pathway of cell pyroptosis

**1.2.1 细胞焦亡的经典途径** 细胞焦亡的经典途径为 caspase-1 依赖的炎症小体途径<sup>[5]</sup>。病原体感染后激活固有免疫,非特异性免疫细胞上的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRR)能够识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)和损伤相关分子模式(danger-associated molecular patterns, DAMP)。激活的 PRR 进一步触发炎症小体。炎症小体是由胞浆内 PRR 参与组装形成的多蛋白复合物,由受体蛋白、含 caspase 募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)和 pro-caspase 1 3 部分构成。炎症小体的受体蛋白包括 NOD 样受体(nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors, NLR)家族中的 NLRP1、NLRP3、NLRC4、HIN-200 家族的细胞质 DNA 传感器黑色素瘤缺乏因子 2(absent in melanoma 2, AIM2)<sup>[6]</sup>。炎症小体识别 PAMP 或者宿主来源的 DAMP,募集和激活 caspase-1<sup>[7]</sup>。GSDMD 可能是 caspase-1 的下游靶标并且是启动细胞焦亡的重要介质。GSDMD 是一种含有 Gasdermin 结构域的打孔蛋白,相对分子质量约为 53 kDa。GSDMD 不能被凋亡相关的 caspase-3、7、8 切割,而炎症相关的 caspase-1、4、5、11 则能促进 GSDMD 的激活。GSDMD 被活化后的炎性 caspase 切割后,形成两个结构域-22 kDa 的 C 端和 31 kDa 的 N 端。活化后的 GSDMD-N 端能够在细胞上打孔,允许细胞内容物通过,从而改变细胞膜内外离子浓度和渗透压,使细胞肿胀破裂,诱导焦亡发生。caspase-1 又称作白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 转换酶,一般以酶原的形式存在。激活后的 caspase-1 能够切割 IL-1 $\beta$  前体和白介素 18 (IL-18) 前体,使

之成熟形成有活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18,并分泌到细胞外,以募集更多的炎症细胞聚集,扩大炎症反应<sup>[8-9]</sup>。

**1.2.2 细胞焦亡的非经典途径** 细胞焦亡的非经典途径由 caspase-4/5/11 介导,caspase-4/5/11 与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 结合后被寡聚化而激活<sup>[10]</sup>。caspase-4 被激活能直接裂解 IL-1 $\beta$  和 IL-18 前体。活化的 caspase-11 则表现出蛋白酶活性,裂解 GSDMD 蛋白,形成的 GSDMD 蛋白 N 端介导细胞膜穿孔,诱导细胞焦亡。同时 caspase-11 也可以激活 NLRP3 炎症小体进而触发 caspase-1 活化,从而间接参与活性 IL-1 $\beta$  和 IL-18 分泌<sup>[11-12]</sup>。此外,caspase-11 与 LPS 特异性结合后,激活后的 caspase-11 也可以剪切修饰缝隙连接蛋白的跨膜通道 Pannexin-1,促进 Pannexin-1 活化,释放 ATP 与细胞膜上 P2X7 受体结合,打开细胞膜上的 P2X7 通道,引起细胞膜穿孔,释放内容物,诱导细胞焦亡<sup>[13-14]</sup>。

**1.2.3 细胞焦亡与细胞凋亡的联系** 细胞焦亡和凋亡是 caspase 依赖的程序性细胞死亡途径,但是凋亡的发生主要由凋亡性 caspase (Caspase-2、3、6、7、8、9 或人类 caspase-10) 介导,伴随着凋亡小体形成,而焦亡则是由炎症性 caspase (caspase-1、4、5、11) 诱导的一类坏死性和炎症性的细胞程序性死亡。二者虽然是不同的细胞死亡方式,但是在发生过程中也存在一定的联系。例如 caspase-8 虽然作为凋亡的主要调控因子,在转化生长因子  $\beta$  激活激酶 1(transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1, TAK1) 和 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (inhibitor of  $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 激酶复合物活性的活性受到阻滞时,则 caspase-8 途径会被激活,caspase-8 可能通过诱导细胞膜损伤而触发 NLRP3 的组装,从而导致该部位 GSDMD 的裂解和活化<sup>[15]</sup>。caspase-3 一直被认为是细胞凋亡的主要调控因子,在肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF) 或化疗药物的诱导下,caspase-3 能够裂解 GSDME(gasdermin E),从而使细胞膜穿孔,诱导焦亡<sup>[11,16-17]</sup>。因此,caspase-3 通过 caspase-3/GSDME 信号通路,将细胞凋亡和焦亡连接起来,当 GSDME 高表达时,活跃的 caspase-3 剪切并释放其 N 端结构域在细胞膜上穿孔,导致细胞肿胀、破裂和死亡;当 GSDME 表达较低时,将导致肿瘤细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

**2 细胞焦亡与嗜神经病毒感染**

病毒感染可以通过不同的途径触发程序性细胞死亡,包括凋亡、焦亡和坏死。研究发现在腺病毒、鼻病毒等病毒感染中存在细胞焦亡现象<sup>[19-20]</sup>。嗜神经病毒能够造成严重的中枢神经系统感染及其并发症,炎性细胞因子介导的免疫炎症反应则发挥重要作用。细胞焦亡是一类坏死性和炎症性的细胞程序性死亡,适度的细胞焦亡有助于细胞内环境的稳定,保护宿主;但是在某些条件下细胞焦亡激活过度,反而引起相关疾病,甚至加重疾病进程。深入认识细胞焦亡在嗜神经病毒感染过程中的分子机制,有助认识相关疾病的发病机制,识别新的抗病毒和免疫治疗靶点。

**2.1 乙脑病毒与细胞焦亡** 乙脑病毒(Japanese encephalitis virus, JEV) 隶属于黄病毒科(Flaviviridae) 黄病毒属(Flavivirus),为单股正链 RNA 病毒。JEV 具有嗜神经性,可引起严重的中枢神经系统疾病,即流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis, JE)。JEV 通过感染病毒蚊虫叮咬感染人类后,穿过血脑屏障侵入中枢神经系统,直接靶向神经元导致细胞损伤,通过小

胶质细胞激活在内的强炎症反应,进一步导致神经细胞损伤和坏死。JEV感染过程中,能够广泛激活所有已知的PCD,特别是凋亡、焦亡和坏死。

Kaushik等<sup>[21]</sup>研究发现,BALB/c小鼠以 $5 \times 10^5$  PFU剂量感染JEV后,其脑组织中IL-1 $\beta$ 和IL-18 mRNA含量在感染后3、5、7天均显著增加,ELISA检测脑内IL-1 $\beta$ 和IL-18含量也显著增加;以小鼠角质细胞BV-2作为体外模型的结果与体内模型一致,提示JEV感染可导致小胶质细胞激活。BV-2细胞和小鼠感染JEV后,caspase-1活性显著增高;使用caspase-1抑制剂(YVAD)后,IL-1 $\beta$ 和IL-18水平显著降低。NLRP3作为识别ssRNA和双链DNA病毒的关键炎症小体分子之一,在JEV感染过程中也发挥了重要作用。经过NLRP3敲低处理的JEV感染组与单纯JEV感染组相比,IL-1 $\beta$ 和IL-18水平显著降低。这表明,在JEV感染过程中,病毒复制激活了NLRP3炎症小体复合物,炎症小体进一步激活caspase-1活性,并随后切割前炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18,使之成熟和释放;ROS的产生和K<sup>+</sup>离子外流在JEV感染后NLRP3炎症小体的激活过程发挥了重要作用。

Wang等<sup>[22]</sup>使用C57BL/6J小鼠进行JEV腹腔原位感染,发现巨噬细胞在JEV感染后发生M1极化,并表现出强烈的先天免疫和炎症通路激活,几乎所有的程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD)通路都被激活,尤其是凋亡、焦亡和坏死通路;进一步的转录组学分析和TUNEL染色显示,JEV感染引起了明显的DNA损伤;促进ROS和RNS的生成,引起氧化应激,激活多个细胞死亡通路。该课题组还发现,Axl<sup>-/-</sup>小鼠(Axl:一种受体酪氨酸激酶)在JEV感染时表现出更高的死亡率。Axl缺乏通过白细胞介素-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )水平的显著升高介导对JEV感染的影响,IL-1 $\alpha$ 破坏血脑屏障,促进病毒入侵神经系统。通过原位感染模型,发现死亡的巨噬细胞是血清IL-1 $\alpha$ 水平升高的主要来源。间接免疫荧光染色结果显示,JEV感染的巨噬细胞中,焦亡标记物GSDMD-N和凋亡标记物TUNEL明显增高,而坏死标记物RIPK1则没有明显改变,提示JEV感染的腹腔巨噬细胞死亡途径主要为焦亡和凋亡,而非坏死。在JEV感染的Axl<sup>-/-</sup>小鼠巨噬细胞中可观察到caspase-1和GSDMD的转录显著增强。Axl通过激活PI3K-Akt信号通路抑制JEV感染的腹腔巨噬细胞的焦亡和凋亡。但是巨噬细胞焦亡释放的主要效应因子是IL-1 $\alpha$ 而不是IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\alpha$ 拮抗剂的作用能有效地预防乙脑的发生,提示IL-1 $\alpha$ 拮抗剂可能是乙脑治疗的候选药物。以上研究结果提示,Axl通过激活PI3K-Akt信号通路抑制JEV感染的腹腔巨噬细胞的焦亡和凋亡,Axl对JEV感染具有一定的保护作用,巨噬细胞释放的IL-1 $\alpha$ 是促进乙脑神经侵袭的重要因子<sup>[23]</sup>。

**2.2 寨卡病毒与细胞焦亡** 寨卡病毒(Zika virus,ZIKV)同JEV同属于黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)。ZIKV主要通过感染病毒的伊蚊叮咬进行传播,与JEV的传播方式相似,感染后主要表现为发热、皮疹、关节痛或结膜炎。近年来,研究发现,ZIKV具有高度嗜神经特性,ZIKV感染可造成神经系统损害,如胎儿小头畸形、格林-巴列综合征、急性脊髓炎和脑膜脑炎等,对人类健康造成的巨大威胁<sup>[24-25]</sup>。

研究认为,ZIKV侵入大脑后,感染神经前体细胞、星形胶质细胞、少突胶质前体细胞和小胶质细胞,导致细胞周期停滞、

凋亡和分化异常,出现皮质变薄和小头畸形<sup>[22]</sup>。然而有研究显示,ZIKV阳性的小头症患者脑组织样本NLRP1、NLRP3和AIM2受体、细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-18和IL-33以及caspase-1、iNOS和精氨酸酶1的表达均显著升高,提示炎症小体相关基因激活,表明炎症小体的激活和细胞焦亡可能加重ZIKV相关性小头症新生儿的神经炎症,从而增加中枢神经系统的损害<sup>[26]</sup>。Zhen等<sup>[27]</sup>研究显示,ZIKV感染会引起神经祖细胞发生焦亡,使用caspase-1抑制剂(VX-765)或敲除caspase-1可减少ZIKV诱导的炎症反应和焦亡,并能明显减轻神经病变和脑萎缩。进一步研究表明,ZIKV感染引起严重的炎症病理改变,并促进了IL-1 $\beta$ 的产生;在ZIKV感染过程中IL-1 $\beta$ 的成熟和分泌是由NLRP3炎症小体激活介导的,ZIKV非结构蛋白5(NS5)促进NLRP3炎症小体复合物的组装,通过与NLRP3的相互作用和诱导活性氧的产生导致IL-1 $\beta$ 的激活<sup>[28]</sup>。Yamaoka等<sup>[29]</sup>则发现,ZIKV蛋白酶直接将GSDMD切割成N端片段(1-249),以不依赖caspase的方式导致细胞焦亡,可能是ZIKV诱导细胞死亡和随后的炎症反应的直接机制。

**2.3 西尼罗病毒与细胞焦亡** 西尼罗病毒(West Nile virus,WNV)也是一种蚊虫传播的黄病毒,目前广泛流行于温带和热带地区。人类感染WNV后,通常引起轻微的疾病——西尼罗热,但也可以引发严重的神经系统疾病,如病毒性脑炎、脑膜炎、脊髓灰质炎样疾病,其具体机制尚不清楚<sup>[30]</sup>。

Kumar等<sup>[31]</sup>研究表明,WNV感染小鼠骨髓源性树突状细胞(BMDC)(MOI=0.1)后48h能够诱导IL-1 $\beta$ 和caspase1 mRNA表达,且该诱导在野生型(WT)和ASC<sup>-/-</sup>小鼠之间相当;但是野生型小鼠感染WNV后BMDC细胞中IL-1 $\beta$ 的剪切形式增加,ASC<sup>-/-</sup>小鼠的增加程度则明显低于野生型;WT小鼠BMDC在感染48h和72h后,caspase1的P20亚基显著增加,ASC<sup>-/-</sup>小鼠BMDC的增加程度明显低于WT,这种变化与剪切的IL-1 $\beta$ 水平降低密切相关。上述结果显示,在WNV感染后,尽管在WT和ASC<sup>-/-</sup>BMDC中IL-1 $\beta$ 和caspase-1 mRNA水平相当,但ASC<sup>-/-</sup>BMDCs中caspase-1切割减少,表明WNV感染诱导炎症小体组装,caspase-1的激活需要ASC,ASC缺乏影响caspase-1激活,而非基因转录。

Kumar等<sup>[32]</sup>还发现,在感染WNV-NY99的小鼠大脑中NLRP3和NLRC5等形成炎症小体的重要分子水平升高。Lim等<sup>[33]</sup>使用转录组学来比较在感染WNV和CHIKV早期和晚期的小鼠大脑中诱导的效应通路,除了凋亡和自噬等常见的细胞死亡途径,发现了细胞焦亡和坏死标志物的差异表达的证据,提示细胞焦亡和坏死可能是重要的发病机制组成。

**2.4 狂犬病病毒与细胞焦亡** 狂犬病病毒(Rabies virus,RABV)属于弹状病毒科狂犬病病毒属的成员,是一种典型的嗜神经病毒,可以引起犬、猫和多种野生动物感染,并可以通过咬伤或密切接触感染人类引起狂犬病。狂犬病是目前病死率最高的传染病。一旦感染者出现神经系统症状,只能给予姑息治疗,死亡是不可避免的。狂犬病的发病机制尚不清楚。研究发现,病毒复制引起的细胞死亡和宿主反应可能在狂犬病的发病机制中发挥重要作用。焦亡是细胞死亡的一种主要促炎途径,不仅可能导致狂犬病期间的神经元损失,而且可能导致神经功能障碍。

Kip<sup>[34]</sup>等将两株 RABV(强毒株 CVS-11 和减毒株 ERA) 感染 Mf4/4 巨噬细胞,发现病毒感染可激活 caspase-1、IL-1 $\beta$  和 IL-18,以及 caspase-3、-7、-8 和-9,表明 RABV 感染可诱导 caspase-1,3 介导的细胞死亡;动物试验发现,caspase-1/11 双缺陷能够加重 ERA 感染的疾病严重程度,推测 caspase-1 和/或 caspase-11 介导的焦亡在抑制 RABV 弱毒株引起的疾病过程中起重要作用。Koraka 等<sup>[35]</sup>将两株 RABV(DUVV-NL07 和实验室适应株 RABV-PV)感染 BALB/c 小鼠,取脑组织进行 mRNA 表达谱分析,发现两种不同的 RABV 感染转录组谱无显著差异,均可导致 I 型干扰素(IFN)、趋化因子和促炎细胞因子的表达增加,IFN 信号通路基因上调,PYCARD、RIG-I 和 MDA5 等炎症小体形成相关分子 mRNA 表达水平均升高, Gasdermin D、caspase-1 和 caspase-4 mRNA 水平也升高。研究结果提示,在缺乏显著的神经元凋亡的情况下,神经元的死亡是通过焦亡途径介导的。

为了进一步探索干预细胞焦亡对于疾病的治疗作用, Koraka 等<sup>[36]</sup>使用 caspase-1 抑制剂(Ac-YVAD-cmk)或 IL-1 $\beta$  抑制剂(Kineret)对感染 SHBRV-18 的 C57BL/6 小鼠进行治疗。SHBRV-18 感染小鼠后 caspase-1 和 IL-1 $\beta$  mRNA 表达水平显著升高;抑制 caspase-1 能够显著延长小鼠的中位生存时间,焦亡相关的关键分子 mRNA 表达被抑制到接近基线水平(caspase-1 和 IL-1 $\beta$ ),甚至更低(IL-18)。但是 TNF- $\alpha$  没有被完全抑制到基线水平,这表明除了焦亡外,狂犬病期间可能会激活更多的炎症途径。IL-1 $\beta$  抑制剂 Kineret 虽然能够抑制 caspase-1 和 IL-1 $\beta$  表达至基线水平,IL-18 的表达下调至基线水平之下,但是对感染小鼠的生存没有显著影响。Martina 等<sup>[37]</sup>使用 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、利巴韦林和 favipiravir 作为抗病毒药物,caspase-1、TNF- $\alpha$  和 MAP-kinase 作为免疫调节靶点,对感染 RABV 小鼠进行联合治疗。结果发现,抗病毒药物和免疫调节剂联合治疗能够显著增加生存时间,降低脑和脊髓中的病毒 RNA,该治疗影响与焦亡和凋亡有关的蛋白质转录水平,caspase-1 mRNA 的表达显著降低。因此,将 caspase-1 抑制剂纳入联合治疗方案可能通过减轻 RARV 感染后下游过度和可能有害的促炎反应,对狂犬病的病程产生积极影响,有利于增加狂犬病患者的生存机会。

**2.5 肠道病毒 71 型与细胞焦亡** 肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)属于小 RNA 病毒科(Picornaradae)肠道病毒属(Enterovirus)的成员,归属于人类肠道病毒 A。EV71 是手足口病的主要病原,目前已知 EV71 感染主要导致手足口病、疱疹性咽峡炎,有时伴有中枢神经系统(CNS)并发症,如无菌性脑膜炎、急性弛缓性麻痹和脑脊髓炎等。EV71 感染所致脑脊髓炎死亡病例显示,神经元呈现变性/坏死,是主要的病毒作用靶点。因此,病毒诱导的神经元细胞死亡可能在发病机制中起着重要作用。

EV71 感染导致疾病的严重程度与促炎症细胞因子的产生和 PCD 有关。Yogarajah 等<sup>[38]</sup>对 EV71 感染后的人神经母细胞瘤(SK-N-SH)细胞进行了芯片/转录组分析,提示 AIM2 炎症小体参与病毒感染过程,推测焦亡可能是 EV-71 诱导的神经元细胞死亡的重要机制。RT-qPCR、Western blot、免疫荧光和流式细胞术检测结果一致显示,在 EV-71 感染的 SK-N-SH 细胞中,AIM2 基因和蛋白表达上调,下游基因 CARD16、caspase-

1 和 IL-1 $\beta$  也被上调,caspase-1 被激活形成裂解的 caspase-1 p20 亚基。7-AAD 染色呈阳性,提示感染细胞有焦亡现象(细胞发生焦亡时膜完整性丧失,7-AAD 易于渗透进入细胞,因此该染料可以用作标记来区分从细胞凋亡和焦亡)。免疫组化检测显示,EV71 脑脊髓炎患者中枢神经系统炎症区神经元高表达 AIM2 及病毒抗原。在 AIM2 敲除细胞中,AIM2 及其下游相关基因表达和焦亡被抑制,导致病毒感染显著增加。上述结果表明,AIM2 炎症小体介导的焦亡是神经元死亡的重要机制,可能在限制 EV71 复制中发挥重要作用。该研究还发现,病毒 RNA 转染 SK-N-SH 细胞后,AIM2 基因上调和激活,提示 AIM2 炎症小体装配可由胞质 EV71 RNA 触发,紫外线损伤的 RNA 可能无法激活 AIM2 炎症小体。然而,AIM2 与 EV-71 RNA 相互作用的具体机制尚不清楚。

Wang 等<sup>[39]</sup>发现,EV71 复制导致 NLRP3 炎症小体的激活和 IL-1 $\beta$  的分泌,更值得关注的是,EV71 存在抑制抗病毒免疫的机制,通过病毒蛋白酶 2A 和 3C 裂解来抑制 NLRP3 炎症小体的激活,EV71 3C 与 NLRP3 相互作用抑制 IL-1 $\beta$  的表达。Lei 等<sup>[40]</sup>研究显示,EV71 能够诱导细胞焦亡的关键成分 GSDMD 的降解,病毒蛋白酶 3C 直接靶向 GSDMD 并诱导其裂解,裂解位点为 GSDMD 中的 Q193-G194,通过裂解产生一个较短的 N 端片段 GSDMD1-193。值得注意的是,GSDMD1-275 (p30)能够抑制 EV-71 复制,而 GSDMD1-193 则不能触发细胞死亡或抑制 EV71 复制,提示这可能时 EV-71 逃避抗病毒反应的新策略。研究还显示,T239 和 F240 是 GSDMD1 275 诱导细胞焦亡的关键位点。

Bai 等<sup>[41]</sup>发现 EV71 感染引起 RD 和 SH-SY5Y 细胞收缩、核凝结、线粒体电位降低和膜磷脂酰丝氨酸易位。在病毒诱导的细胞死亡过程中,还观察到 caspase-9 的活化、多聚(ADP-核糖体)聚合酶的裂解和乳酸脱氢酶的释放。未检测到激活的 GSDMD 和磷酸化混合系例蛋白激酶结构域蛋白(p-MLKL)。表明 EV71 诱导的细胞死亡主要是通过内在途径凋亡,而不是通过 GSDMD 介导的焦亡和 p-MLKL 介导的坏死。

上述研究出现矛盾的结论,可能是由于不同的细胞系在体外,或不同的组织在体内,或不同的感染阶段在宿主。不同细胞系感染 EV71 表现出病毒复制的组织特异性动力学,这一动力学过程也依赖于 MOI;不同毒力的病毒株是否与细胞死亡的类型有关尚不清楚。

**3 小结与展望**

在嗜神经病毒感染过程中,病毒诱导的细胞死亡和炎症细胞因子介导的免疫炎症反应关,而炎症细胞因子的产生通常与程序性细胞死亡有关。神经元细胞的死亡通常是由细胞凋亡和坏死引起的。然而,对细胞死亡机制理解的研究进展表明,细胞焦亡在宿主抵御病毒感染、促炎反应、病毒复制和逃避宿主免疫反应中发挥着重要作用。适度的细胞焦亡有助于细胞内环境的稳定,可以有效防止细胞过度增殖,从而保护宿主。但是在某些条件下激活过度,引发炎症因子风暴,反而引起严重的组织损伤,加速疾病进展,甚至危及生命。目前,研究发现细胞焦亡参与嗜神经病毒感染过程,抑制细胞焦亡产生的促炎反应,有可能对疾病的发展产生积极影响。然而,嗜神经病毒感染过程中细胞焦亡相关具体通路机制尚未被完全阐释,加深细胞焦亡在相关疾病发生发展和转归中的作用和分子机制

认识,可为病毒感染探寻新的药物靶点和新的治疗策略的提供理论基础。

#### 【参考文献】

- [1] Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages[J]. Nature, 1992, 358(6382):167-169.
- [2] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death[J]. Trends Microbiol, 2001, 9(3):113-114.
- [3] Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis[J]. Mol Microbiol, 2000, 38(1):31-40.
- [4] Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11; implications in TLR4-independent endotoxemic shock[J]. Science, 2013, 341(6151):1250-1253.
- [5] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2):99-109.
- [6] Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation[J]. Immunol Rev, 2015, 265(1):6-21.
- [7] Chen I Y, Ichinohe T. Response of host inflammasomes to viral infection[J]. Trends Microbiol, 2015, 23(1):55-63.
- [8] Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions[J]. Cell, 2016, 165(4):792-800.
- [9] Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles[J]. J Leukoc Biol, 2016, 100(5):961-967.
- [10] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4[J]. Science, 2013, 341(6151):1246-1249.
- [11] Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS[J]. Nature, 2014, 514(7521):187-192.
- [12] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. Nature, 2015, 526(7575):666-671.
- [13] 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[J]. Immunity, 2015, 43(5):923-932.
- [14] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. Immunol Rev, 2017, 277(1):61-75.
- [15] Chen KW, Demarco B, Heilig R, et al. Extrinsic and intrinsic apoptosis activate pannexin-1 to drive NLRP3 inflammasome assembly [J]. EMBO J, 2019, 38(10):e101638.
- [16] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature, 2017, 547(7661):99-103.
- [17] Ding J, Wang K, Liu W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. Nature, 2016, 535(7610):111-116.
- [18] Jiang M, Qi L, Li L, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer[J]. Cell Death Discovery, 2020(6):112.
- [19] Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(8):e1002857.
- [20] Triantafilou K, Kar S, van Kuppeveld FJ, et al. Rhinovirus-induced calcium flux triggers NLRP3 and NLRC5 activation in bronchial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(6):923-934.
- [21] Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, et al. NLRP3 inflammasome: key mediator of neuroinflammation in murine Japanese encephalitis[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e32270.
- [22] Wang ZY, Zhen ZD, Fan DY, et al. Transcriptomic analysis suggests the M1 polarization and launch of diverse programmed cell death pathways in Japanese encephalitis virus-infected macrophages[J]. Viruses, 2020, 12(3):356.
- [23] Wang ZY, Zhen ZD, Fan DY, et al. Axl deficiency promotes the neuroinvasion of Japanese encephalitis virus by enhancing IL-1 $\alpha$  production from pyroptotic macrophages[J]. J Virol, 2020, 94(17):e00602-20.
- [24] Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly[J]. N Engl J Med, 2016, 374(10):951-958.
- [25] Oehler E, Watrin L, Larre P, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013[J]. Euro Surveill, 2014, 19(9):20720.
- [26] de Sousa JR, Azevedo RSDS, Martins Filho AJ, et al. In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases[J]. Cytokine, 2018(111):255-264.
- [27] He Z, An S, Chen J, et al. Neural progenitor cell pyroptosis contributes to Zika virus-induced brain atrophy and represents a therapeutic target[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(38):23869-23878.
- [28] He Z, Chen J, Zhu X, et al. NLRP3 inflammasome activation mediates Zika virus-associated inflammation[J]. J Infect Dis, 2018, 217(12):1942-1951.
- [29] Yamaoka Y, Matsunaga S, Jeremiah SS, et al. Zika virus protease induces caspase-independent pyroptotic cell death by directly cleaving gasdermin D[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021(534):666-671.
- [30] Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, et al. West Nile virus: biology, transmission, and human infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4):635-648.
- [31] Kumar M, Roe K, Orillo B, et al. Inflammasome adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) is critical for the immune response and survival in West Nile virus encephalitis[J]. J Virol, 2013, 87(7):3655-3667.
- [32] Kumar M, Belcaid M, Nerurkar VR. Identification of host genes leading to West Nile virus encephalitis in mice brain using RNA-seq analysis[J]. Sci Rep, 2016(6):26350.
- [33] Lim SM, van den Ham HJ, Oduber M, et al. 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[J]. Front Microbiol, 2017(8):1556.

- tion[J]. Pathogens, 2021, 10(4):468.
- [49] Diop F, Vial T, Ferraris P, et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. PLoS One, 2018, 13(10):e0206093.
- [50] Chen Q, Gouilly J, Ferrat YJ, et al. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta[J]. Nat Commun, 2020, 11(1):2967.
- [51] Melo CFOR, Delafiori J, de Oliveira DN, et al. Serum metabolic alterations upon Zika infection[J]. Front Microbiol, 2017(8):1954.
- [52] Roe B, Kensicki E, Mohny R, et al. Metabolomic profile of hepatitis C virus-infected hepatocytes[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23641.
- [53] Gilany K, Mohamadkhani A, Chashmian S, et al. Metabolomics analysis of the saliva in patients with chronic hepatitis B using nuclear magnetic resonance: a pilot study[J]. Iran J Basic Med Sci, 2019, 22(9):1044-1049.
- [54] Wang JB, Pu SB, Sun Y, et al. Metabolomic profiling of autoimmune hepatitis: The diagnostic utility of nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. J Proteome Res, 2014, 13(8):3792-3801.
- [55] Dittarot K, Jittornatam P, Wilairat P, et al. Urinary metabolomic profiling in chronic hepatitis B viral infection using gas chromatography/mass spectrometry[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(3):741-748.
- [56] Raijmakers RPH, Roerink ME, Jansen AFM, et al. Multi-omics examination of Q fever fatigue syndrome identifies similarities with chronic fatigue syndrome[J]. J Transl Med, 2020, 18(1):448.
- [57] 魏文峰, 褚衍涛, 刘焯, 等. 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱技术的肺炎支原体感染小鼠血清代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7):1382-1389.
- [58] Li J, Luu LDW, Wang X, et al. Metabolomic analysis reveals potential biomarkers and the underlying pathogenesis involved in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1):593-605.
- [59] Kumar A, Misra BB. Challenges and opportunities in cancer metabolomics[J]. Proteomics, 2019, 19(21-22):e1900042.
- 【收稿日期】 2022-03-05 【修回日期】 2022-05-17

(上接 856 页)

- [50] Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, et al. Rapid detection of *Brucella spp.* by the loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Appl Microbiol, 2008, 104(6):1815-1823.
- [51] 蔺国珍. 布鲁氏菌病 LAMP 检测方法的建立及双基因共表达分子疫苗研究[D]. 中国农业科学院, 2012.
- [52] 秦雪, 付世骞, 杨鑫焱, 等. 重组酶聚合酶等温扩增技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2020, 1-12.
- [53] Ren H, Yang M, Zhang G, et al. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for detection of *Brucella* in blood samples[J]. Mol Cell Probes, 2016, 30(2):122-124.
- [54] 戴媛媛, 马筱玲. 宏基因组二代测序技术在临床病原学诊断中的应用[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(1):1-5.
- [55] Zhao M, Tang K, Liu F, et al. Metagenomic Next-generation sequencing improves diagnosis of osteoarticular infections from abscess specimens: a multicenter retrospective study[J]. Front Microbiol, 2020(11):2034.
- [56] Fan S, Ren H, Wei Y, et al. Next-generation sequencing of the cerebrospinal fluid in the diagnosis of neurobrucellosis[J]. Int J Infect Dis, 2018(67):20-24.
- 【收稿日期】 2022-02-18 【修回日期】 2022-05-08

(上接 861 页)

- [34] Kip E, Naze F, Suin V, et al. Impact of caspase-1/11, -3, -7, or IL-1 $\beta$ /IL-18 deficiency on rabies virus-induced macrophage cell death and onset of disease[J]. Cell Death Discov, 2017(3):17012.
- [35] Koraka P, Martina BEE, van den Ham HJ, et al. Analysis of mouse brain transcriptome after experimental Duvhage virus infection shows activation of innate immune response and pyroptotic cell death pathway[J]. Front Microbiol, 2018(9):397.
- [36] Koraka P, Martina BEE, Smreczak M, et al. Inhibition of caspase-1 prolongs survival of mice infected with rabies virus[J]. Vaccine, 2019, 37(33):4681-4685.
- [37] Martina BEE, Smreczak M, Orłowska A, et al. Combination drug treatment prolongs survival of experimentally infected mice with silver-haired bat rabies virus[J]. Vaccine, 2019, 37(33):4736-4742.
- [38] Yogarajah T, Ong KC, Perera D, et al. AIM2 Inflammasome-mediated pyroptosis in Enterovirus A71-infected neuronal cells restricts viral replication[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):5845.
- [39] Wang H, Lei X, Xiao X, et al. Reciprocal regulation between Enterovirus 71 and the NLRP3 inflammasome[J]. Cell Rep, 2015, 12(1):42-48.
- [40] Lei X, Zhang Z, Xiao X, et al. Enterovirus 71 Inhibits pyroptosis through cleavage of gasdermin D[J]. J Virol, 2017, 91(18):e01069-17.
- [41] Bai J, Chen X, Liu Q, et al. Characteristics of enterovirus 71-induced cell death and genome scanning to identify viral genes involved in virus-induced cell apoptosis[J]. Virus Res, 2019(265):104-114.
- 【收稿日期】 2022-02-27 【修回日期】 2022-05-12