

Research on the Mechanism of Sepsis and the Review of Current Development of Drug Therapy

Xiumin Bu Qinglong Guo*

China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210000, China

Abstract

Sepsis is a common and fatal disease that occurs in hospitalized patients, which is characterized by a disordered host systemic response to infection. Sepsis has various manifestations and complex pathophysiological processes. The strong inflammatory response caused by pyroptosis, which is a pro-inflammatory programmed death of a large number of cells in the body, is the biological basis of sepsis. Lipopolysaccharide (LPS), which enters the cytoplasm, causes the activation of Caspase-11, and activates the pyroptosis pathway mediated by it, is an important mechanism for sepsis. Targeted therapy drugs developed for this mechanism have great potential. This paper discusses the pathogenesis of sepsis, clarifies the role of Caspase-11-mediated pyroptosis pathway in sepsis, and integrates the current main drug categories for sepsis treatment. Through this review, we have a more comprehensive understanding of the research on the mechanism of sepsis and the development of drug treatment.

Keywords

sepsis; pyroptosis; Caspase-11; pathogenesis; therapeutic drugs

脓毒症的机制研究及当前的治疗药物发展综述

卜修民 郭青龙*

中国药科大学, 中国·江苏南京 210000

摘要

脓毒症是一种在住院患者中发生普遍且致死率很高的疾病,其特征在于宿主对感染的全身性反应失调。脓毒症病情表征多样,病理生理过程复杂。机体大量细胞发生细胞焦亡这一促炎型程序性死亡方式所导致的强烈炎症反应是脓毒症发生的生物学基础。脂多糖(LPS)进入细胞质中,引起含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase, Casp)-11活化,进而激活其所介导的细胞焦亡通路是脓毒症发生的重要原因,针对这一机制所开发的靶向治疗药物潜力巨大。论文阐述了脓毒症的发病机制,阐明Caspase-11介导的细胞焦亡通路在脓毒症中的作用,整合了目前抗脓毒症的主要药物类别。通过本综述,期望对脓毒症的机制研究和治疗药物发展有更全面的了解。

关键词

脓毒症; 细胞焦亡; Caspase-11; 发病机制; 治疗药物

1 引言

脓毒症是机体对感染的反应失调进而导致的可能危及生命的器官功能障碍性疾病。随着研究者的不懈钻研,科研工作者对脓毒症的基本发病原理以及病情影响因素的认知已经有了长足进步,脓毒症的临床治疗手段也不断得到优化,但令人遗憾的是,脓毒症的发生率与病死率仍然居高不下。许

多感染病症患者最终会患上脓毒症,每年大约有1%~2%的住院患者会患上脓毒症,全球每年大约有超过三千万人口会感染脓毒症^[1]。脓毒症的临床表征多样,诱发机制复杂,医生对脓毒症患者的诊断,病情评级,治疗和医护管理方面面临诸多挑战。2012年,全球脓毒症联盟及其创始成员设定9月13日为世界脓毒症日^[2],以加强公众对于它的认识。

2 脓毒症的发病机制

机体对原发性感染的反应失调进而导致免疫系统失衡、器官功能紊乱和机体系统性损伤,最终诱发脓毒症这一严重病症。临床上,脓毒症可以由严重烧伤、腹膜炎、脓肿等疾

【作者简介】卜修民(1995-),男,中国江苏南京人,硕士,从事抗炎药理研究。

【通讯作者】郭青龙(1960-),男,中国陕西宝鸡人,博士,从事药理学研究。

病所引起的病原微生物(如细菌、真菌)的感染诱发。脓毒症发生发展过程中患者会出现心动过速、呼吸急促、急性肺损伤、肾损伤等症状,进而会引发脓毒性休克和多器官功能不全。脓毒症的分子生物学机制非常复杂,涉及炎症反应失调,免疫功能异常,线粒体损伤,凝血系统紊乱,神经内分泌免疫网络异常等病理过程。

2.1 炎症反应失调

炎症反应失调是脓毒症发生的重要原因。为了应对来自病原体的外源因子(如LPS)或受伤细胞释放的内源性因子(如HMGB-1),宿主会通过巨噬细胞感知并清除病原体,产生一系列的炎症相关的细胞因子,促炎和抗炎反应的失衡持续刺激机体,免疫反应的失调引发细胞因子风暴激活先天性免疫系统。对于入侵的病原体,宿主首先会通过巨噬细胞感知并吞噬病原体,产生一系列的促炎性细胞因子,进而引发细胞因子风暴并激活先天性免疫系统。当先天性免疫系统激活时,模式识别受体(PRR)监测内源性危险相关分子模式(DAMPs)或微生物相关分子模式(MAMPs)来启动免疫细胞的一系列激活,增加炎症相关基因的表达。在脓毒症引发的免疫反应中,机体受到的原发性感染导致病原体相关分子模式(PAMPs)会被各种PRR识别,如Toll样受体(TLR)、C型凝集素受体(CLR)、RIG-I样受体(RLR)和NOD样受体(NLR)。其中TLR已得到最广泛的研究。TLR及其配体之间的相互作用由其Toll/IL-1受体结构域(TIR)结构域诱导的,它的激活导致下游c-Jun N端激酶(JNK),细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2),p38促分裂原激活蛋白的活化激酶(MAPK)和核因子- κ B(NF- κ B)信号通路通过髓样分化因子88(MyD88)依赖性通路激活,表达前体形式的炎性细胞因子,如IL-1、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、干扰素(IFN)调节因子7(IRF7)和衔接蛋白1(AP-1)。

2.2 免疫功能障碍

免疫功能障碍也是脓毒症发生的原因之一,免疫功能障碍包括人类白细胞DR抗原(HLA-DR)表达降低,程序性细胞死亡大量发生,抗炎分子表达增加以及细胞共抑制受体和配体表达增多等。

脓毒症中涉及的免疫抑制包括先天性免疫和适应性免疫抑制。脓毒症时的免疫功能障碍会引起脾和淋巴结的树突状

(DC)细胞的成熟过程受到阻碍,脓毒症中树突状细胞的激活会引起免疫细胞(包括单核细胞、自然杀伤(NK)细胞和中性粒细胞)的快速堆积;单核细胞在脓毒症的病理发展中起到重要作用,单核细胞的代谢缺陷被认为是免疫抑制的一种表现,通常体现在糖酵解,脂肪酸氧化和氧化磷酸化等代谢过程的抑制;同时脓毒症中免疫抑制受CD80/B7-1等共刺激分子的调节,这些分子通过TLR信号通路激活产生,在细胞因子诱导下幼稚T细胞分化为调节性T细胞,并最终导致抗原呈递相关转录因子的表达降低。

2.3 凝血系统紊乱

炎症和凝血之间的相互作用被认为是脓毒症发病机理中的关键点。机体为了应对病原微生物在机体中的快速传播,会利用凝血系统发挥对感染的免疫抵抗。

在正常情况下,凝血反应的激活受三个关键的生理抗凝血途径调节,包括组织因子抑制剂途径,活化的蛋白C(APC)途径和抗血栓形成途径。在脓毒症中,这三个途径都呈现一定程度的混乱。由于蛋白质合成受阻,机体三种凝血抑制剂途径的消耗和降解维持在较低水平。由于脓毒症的炎症反应使蛋白C向活化的蛋白C转化,血栓调节蛋白和内皮蛋白C受体的表达下调。此外,在凝血反应剧烈发生时,内源性纤维蛋白溶解作用也明显降低。凝血系统的紊乱导致凝血反应的剧烈发生,危及患者生命。

2.4 其他

此外,脓毒症还会引发线粒体损伤,神经内分泌-免疫网络异常,内质网应激等细胞功能紊乱,严重破坏机体健康。

3 脓毒症与细胞焦亡

越来越多的研究表明Caspase-1/4/5/11炎症小体的激活对于机体调节脓毒症起关键作用。有研究表明把Caspase-1敲除后,可以完全阻止沙门氏菌引起的细胞焦亡。Caspase-11缺失使*B. thailandensis*和*B. pseudomallei*对小鼠更易致死。同时Caspase-4/11在非巨噬细胞中也有功能。它们的激活可能会抑制鼠伤寒沙门氏菌在肠上皮细胞中的扩增,促进受感染的上皮组织的脱落,从而控制小鼠中的细菌增殖。在肺炎支原体感染中,Caspase-4/5/11的活化可以促进含细菌的液泡与溶酶体的融合。Caspase-4/5/11激活发出信号,引起NLRP3

炎性小体的激活并诱导 IL-1 β 分泌。Caspase-11 激活 NLRP3 炎性小体有助于抗菌防御。

3.1 细胞焦亡

细胞程序性死亡是细胞自我消亡的有序现象。它对于生物体的发育, 变态, 组织稳态和发病过程至关重要。随着科学技术的进步, 研究人员发现了区别于细胞凋亡和程序性坏死的另一种细胞程序性死亡类型: 细胞焦亡。它在宿主免疫中呈现炎性死亡形态, 对于机体控制病原体感染至关重要。

细胞焦亡可以分为 Caspase-1 依赖的经典细胞焦亡途径和 Caspase-1 非依赖的非经典细胞焦亡途径两种类型。Caspase-1 非依赖的焦亡途径由人源 Caspase-4/5 或鼠源 Caspase-11 激活引起。

3.2 Caspase-1 介导的细胞焦亡通路

Caspase-1 介导的细胞焦亡通路的激活依赖于炎症小体的形成。当细胞检测到的细胞破损和有害刺激物刺激时组装形成炎症小体, 引发免疫反应。炎症小体由炎症小体受体家族和凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 组成, 它们参与 Caspase-1 前体蛋白的募集和激活。目前, 已知的炎症小体受体包括三种基因家族: Nod 样受体, AIM2 样受体和 Pyrin 受体, 衔接蛋白 ASC 在上皮组织和免疫细胞 (如嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 中表达, 它由两个死亡折叠域组成: 吡啶结构域 (PYD) 和 Caspase 募集结构域 (CARD)。细胞焦亡的起始阶段, 炎症小体通过含有 CARD 或 PYD 结构域的 Nod 样受体 (NLRP1、3、6、7、12, NLRC4), AIM2 或 Pyrin 激活 Caspase-1。CARD 域或 PYD 域通过 CARD-CARD 或 PYD-PYD 相互作用募集并结合 Caspase-1 前体蛋白。Caspase-1 通过 CARD-CARD 或 PYD-PYD 相互作用募集到 ASC 中, 导致其裂解成 N 端前体结构域和 C 端催化和相互作用结构域, 所有半胱天冬酶都含有两个重要的半胱天冬酶催化结构域: p10 亚基和 p20 亚基。这两个裂解的 C 催化域彼此整合并形成成熟的 Caspase-1。

3.3 Caspase-11 介导的细胞焦亡通路

在 1990 年代中期, 研究者成功地培养了 Caspase-1 基因敲除型 (Caspase-1^{-/-}) 和 Caspase-11 基因敲除型 (Caspase-11^{-/-}) 小鼠。研究者在 129/sv 小鼠上发现 Caspase-1 和 Caspase-11 基因敲除后小鼠对 LPS 诱导的内毒素休克都具有抗性。随着后来研究的深入, 研究者发现 129/sv 小鼠半身就具有

Caspase-11 基因缺失, 这是它们对于 LPS 诱导的内毒素休克具有抗性的原因。在 2011 年, Kayagaki 观察到 Caspase-11 对于感染了大肠埃希氏菌, 啮齿动物柠檬酸杆菌和霍乱弧菌的巨噬细胞中 IL-1 β 的释放和感染后造成的细胞死亡起到关键作用, 从此揭示了不同的焦亡调控途径。

后来的研究表明, 致死剂量的 LPS 会让敲除 Caspase-11 而不是 Caspase-1 的小鼠免于死亡, 并且 Caspase-11 在引起细胞死亡时不需要 NLRP3 和 ASC。这些数据突显了 Caspase-11 在机体遭受细菌感染时具有独特的促炎作用。

3.4 Gasdermin 家族蛋白 -D (GSDMD)

GSDMD 包含约 480 个氨基酸, 在哺乳动物中高度保守, GSDMD 分为两个结构域, 即 GSDMD-N 端结构域和 GSDMD-C 端结构域, 它们通过铰链区相连。激活的 Caspase-1 和 Caspase-11 会切割 GSDMD 铰链区的天冬氨酸位点, LPS 激活的 Caspase-4/5 也可以观察到类似的 GSDMD 裂解, 而阻断该裂解可使细胞完全抵抗 LPS 的刺激。

GSDMD 是以自抑制状态存在的成孔蛋白, 全长形式不具有成孔活性, Gasdermin-C 端结构域对 GSDMD-N 端的活化存在抑制性结合。GSDMD 铰链区有非常保守的 Caspase-1/4/5/11 切割位点, 当激活的 Caspase-1/4/5/11 切割位点结合到 GSDMD 上, Gasdermin-C 端结构域和 GSDMD-N 端的链接被切断, 自抑制解除, 切割形成的 GSDMD-N 端结构域可以与包括质膜在内的细胞膜结构结合, 诱导哺乳动物细胞焦亡。

3.5 Caspase-11 感知 LPS 的机制

在先天免疫中, 细胞外 LPS 激活 TLR4, 导致 MyD88 依赖的促炎细胞因子编码基因的转录, 包括非活性形式的 IL-1 β 和炎性体成分 (如 NLRP3)。Caspase-4/5/11 是细胞质 LPS 的直接感知器, 一方面细胞外革兰氏阴性细菌可以通过形成细菌外膜囊泡 (OMV) 内吞至细胞内, 随后被 IFN 刺激诱导表达的 GTPases 裂解, LPS 释放至细胞质; 另一方面, 循环系统中的 LPS 也可能通过未知的内吞途径进入细胞质, 通过 LPS 中脂质 A 和 Caspase-4/5/11 中 CARD 结构域的直接结合, 诱导 Caspase-4/5/11 的寡聚和激活, 从而触发抗菌防御和细胞焦亡。

LPS 包含三个结构部分, 脂质 A, 核心寡糖链和可变

多糖链(O抗原)。最保守的脂质A负责Caspase-4/5/11活化。Caspase-4/5/11激活不需要ASC蛋白。Caspase-4/5/11的CARD结构域充当细胞内LPS的直接传感器。活性Caspase-4/5/11裂解GSDMD,从N端片段中去除抑制性C端。与膜脂结合后,GSDMD-N端区域低聚形成孔,导致IL-1家族细胞因子的分泌,并最终导致细胞焦亡。当Caspase-4/5/11的CARD结构域中几个基本残基,特别是Lys19发生突变时,会破坏LPS的结合,也抑制了LPS诱导的Caspase-4/5/11的寡聚,激活以及巨噬细胞焦亡。

4 脓毒症的治疗药物现状

随着研究者对脓毒症发病机理的认识不断加深,脓毒症治疗方案也在不断优化。抗生素、抗病毒药、血管活性剂等治疗药物的应用是脓毒症的经典治疗方案。然而由于特异性较差,针对性不强,治疗存在滞后,其治疗效果甚微。当前的药物开发方向主要集中在调节全身性炎症反应,免疫功能障碍和系统功能紊乱,恢复人体的炎症平衡和机体稳态,改善患者的预后。

4.1 针对炎症失衡的药物

在脓毒症早期,过度的炎症反应和细胞因子风暴是推动脓毒症发展的最关键因素。因此,致炎介质过度释放的及时、适当的拮抗作用成为脓毒症药物治疗的主要目标之一。

4.1.1 细胞因子拮抗剂

早期研究主要关注于调节脓毒症的免疫反应,如注射中和TNF- α 的抗体。抗体的使用在动物研究中获得了满意的结果,但是大多数抗体在临床III期试验中失败。目前,在II/III期临床试验之后,有两种抗体仍然有希望:Afelimomab和CytoFab。Afelimomab是人TNF- α 单克隆抗体的F(ab')₂片段。在严重脓毒症且IL-6释放升高的患者中,研究者发现每8h服用1mg/kg Afelimomab可显著降低循环系统中TNF- α 和IL-6的水平。同时,该疗法也可以加快改善器官功能障碍,使28天全因死亡率降低5.8%。CytoFab是羊IgG Fab片段的无菌亲和纯化制剂。研究表明CytoFab处理组无呼吸机和无ICU生存期天数都显著增加。CytoFab治疗的患者的TNF- α 和IL-6的循环浓度明显低于安慰剂治疗的患者,支气管肺泡灌洗液中的TNF- α 也出现降低^[3]。

4.1.2 PRR拮抗剂

TLR4的抑制被认为对于抗脓毒症治疗是由重要意义的,其原因有两个:第一,即使在革兰氏阳性球菌引起的感染中,循环中LPS的水平也会升高;第二,脓毒症期间宿主细胞释放的一些内源性分子是TLR4敏化剂(如热激蛋白60、HMGB-1和透明质酸)。TAK-242是TLR4的有效抑制剂。作为环己烯衍生物,TAK-242选择性结合TLR4的TIR结构域。TAK-242延长LPS诱导的内毒素血症小鼠的生存期并改善器官功能障碍,当与亚胺培南组联用于盲肠结扎穿刺诱导的脓毒症的小鼠模型中时,盲肠结扎穿刺手术小鼠的死亡率降低,细胞因子释放显著抑制,机体生化指标如尿素和氨基转移酶的循环系统水平表明,该共同治疗可降低器官功能障碍。

4.1.3 非经典炎症小体激活的抑制剂

鉴于胞质中LPS感知激活非经典炎症小体在脓毒症发展中起着关键作用,抑制细胞内LPS介导的Caspase-4/5/11激活和随后的效应可能从根本上有助于抗脓毒症。

研究发现某些抗微生物和抗内毒素肽与LPS结合,可以抑制胞质LPS与其细胞内受体的结合,防治脓毒症。通过体内研究,研究证明内源性肽LL-37可以通过抑制巨噬细胞的焦亡来保护小鼠免于脓毒症。合成的抗LPS肽Pep19-2.5在多种脓毒症动物模型中显示出保护作用,可抑制转染LPS和通过细菌外膜囊泡诱导的单核细胞和巨噬细胞中非经典炎症小体的活化。同样,抗生素阿奇霉素能够特异性阻断单核细胞中LPS诱导的非经典炎症小体活化,这可能是因为降低了NLRP3 mRNA的稳定性。

除了中和LPS,Caspase-4/5/11的治疗靶向还可以通过抑制炎症小体的激活发挥抗脓毒症作用。已显示布鲁氏菌的效应蛋白TcbB抑制TLR2和TLR4信号转导后NF- κ B的活化和促炎性细胞因子的分泌,但也会导致Caspase-4/5/11的泛素化和降解,从而抑制细胞内LPS或沙门氏菌诱导的非经典炎症小体的激活;同样,发现内源性分子氧化磷脂1-棕榈酰-2-花生四烯酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱(oxPAPC)和硬脂酰溶血磷脂酰胆碱(LPC)可以LPS竞争结合Caspase-4/5/11,减少LPS介导的细胞焦亡和IL-1 β 分泌,避免发生脓毒性休克^[4]。

4.2 凝血系统紊乱治疗药物

在脓毒症的发病过程中,凝血系统和炎症反应相互影响,

相互促进,导致凝血-抗凝血系统失衡,最终发生失控的凝血级联反应。因此,抑制异常凝血反应可影响脓毒症的病理过程,产生一定的治疗效果。

4.2.1 重组人 APC (rhAPC)

rhAPC 是目前唯一获得 FDA 批准用于严重脓毒症的临床治疗药物。rhAPC 发挥抗焦亡,抗炎和抗凝作用,并通过调节严重脓毒症激活的凝血异常在炎症调控中发挥作用。但是,PROWESS-SHOCK 临床研究的上市后未能证明 rhAPC 在治疗严重脓毒症和败血性休克中的临床作用,最终导致该药的停药^[9]。

4.2.2 重组人可溶性血栓调节剂

应用重组可溶性血栓调节剂(如重组 TM (rTM)),研究表明对凝血酶的作用是通过调控循环 HMGB-1 的作用发挥的。rhTM 以可溶形式存在于循环系统,其浓度反映脓毒症中凝血异常和器官衰竭的严重程度。在治疗弥散性血管内凝血、动脉粥样硬化和急性呼吸窘迫综合征时,其血浆中浓度降至正常水平。

4.3 抑制免疫功能的药物

持续的免疫功能障碍已成为晚期脓毒症患者死亡的主要原因。抑制免疫细胞焦亡,减少免疫损伤已成为脓毒症治疗药物研究的新重点。

4.3.1 细胞因子

用细胞因子粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)处理可以逆转受损的免疫反应。随机临床试验表明,将 G-CSF 或 GM-CSF 治疗组与安慰剂组比较发现,治疗大大提高了感染逆转率。使用 GM-CSF 治疗严重脓毒症,患者循环 T 细胞中 HLA-DR 的表达均增加,给予 TLR2 或 TLR4 配体后,促炎性细胞因子的释放得到显著改善。

4.3.2 共抑制分子抑制剂

共抑制分子参与脓毒症免疫抑制的发展和进程。PD-1 是一种负刺激分子,可与其配体 PD-L1 结合,并传递抑制信号,阻断免疫细胞的活化,增殖和效应子功能。在免疫调节治疗中,

阻断 PD-1/PD-L1 信号传导是逆转脓毒症免疫抑制的新方法之一。研究者证实抗 PD-1 和抗 PD-L1 抗体分别对脓毒症和严重非脓毒症患者的循环系统生化指标产生积极影响。

5 结语

综上所述,脓毒症的发病机制涉及复杂的炎症发生和器官功能改变过程。Caspase-4/5/11 的激活在抗炎抑菌的同时可能造成了细胞的过度炎症反应,严重的炎症刺激最终引发机体损伤,其所介导的细胞焦亡在脓毒症的发生发展中起着至关重要的作用,对胞质中 LPS 的感知,GSDMD 的活化,致炎介质的释放等方面的针对性调控在抗脓毒症中可能起到很好的作用。当前尚无 FDA 批准的脓毒症治疗药物。脓毒症的治疗还需研究者对脓毒症的基本病理生理过程和诱发病因的准确认知,对高区分度临床诊断标志物的不断发现,病情临床亚型的精确分类和临床分诊治疗策略合理施用。相信在研究者的不断研究下,脓症患者将会得到更具针对性的有效治疗。

参考文献

- [1] Cohen J, Vincent J L, Adhikari N K, et al. Sepsis: a roadmap for future research [J]. *Lancet Infect Dis*, 2015,15(5):581-614.
- [2] Schlapbach L J, Kisson N, Alhawsawi A, et al. World Sepsis Day: a global agenda to target a leading cause of morbidity and mortality [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020,319(3):518-522.
- [3] Rice T W, Wheeler A P, Morris P E, et al. Safety and efficacy of affinity-purified, anti-tumor necrosis factor-alpha, ovine fab for injection (CytoFab) in severe sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2006,34(9):2271-2281.
- [4] Humphries F, Shmuel-GALIA L, Ketelut-Carneiro N, et al. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis [J]. *Science*, 2020,369(6511):1633-1637.
- [5] Bruckner M, Lasarzik I, Jahn-eimermacher A, et al. High dose infusion of activated protein C (rhAPC) fails to improve neuronal damage and cognitive deficit after global cerebral ischemia in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013,551(8):28-33.