

综述

细胞焦亡与心血管疾病的研究进展

王佳慧^{1,2}, 梁欢^{1,2}, 于影^{1,2}, 高琴^{1,2,*}

蚌埠医学院¹生理学教研室; ²心脑血管疾病基础与临床重点实验室, 蚌埠 233000

摘要: 细胞焦亡是一类与炎症反应密切相关、由Gasdermin蛋白介导、依赖于caspase活性的程序性细胞死亡方式, 其典型特征是细胞膜肿胀破裂, 促炎性因子和细胞内容物释放到细胞外环境, 引起机体产生炎症反应。在炎症反应期间, NLRP3、caspase、Gasdermin D (GSDMD)、IL-1 β 等细胞焦亡相关因子在心血管疾病的发生和发展中发挥重要作用。本文着重介绍了细胞焦亡的主要发生机制, 深入分析了细胞焦亡在动脉粥样硬化、冠心病、心肌梗死、糖尿病心肌病、压力超负荷所致的心室重构和心脏肥大、心肌炎、心律失常等心血管疾病中的作用, 并总结了靶向细胞焦亡治疗心血管疾病的潜在治疗方法, 为临床心血管疾病的防治研究提供基础。

关键词: 焦亡; Gasdermin; caspase; 炎症小体; 心血管疾病

中图分类号: R331.3

Research progress on pyroptosis and cardiovascular diseases

WANG Jia-Hui^{1,2}, LIANG Huan^{1,2}, YU Ying^{1,2}, GAO Qin^{1,2,*}

¹Department of Physiology; ²Key Laboratory of Basic and Clinical Cardiovascular Diseases, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China

Abstract: Pyroptosis is a form of programmed cell death which is closely related to the inflammatory response, mediated by Gasdermin protein and depends on the activity of cysteine aspartate specific protease (caspase). Pyroptosis is typically characterized by swelling and rupture of cell membrane, release of proinflammatory factors and cell contents from the plasma membrane to the extracellular environment, which aggravates inflammatory response. During the inflammatory response, NLRP3, caspase, Gasdermin D (GSDMD) and IL-1 β play important roles in the occurrence and development of cardiovascular diseases. In this review, we focus on the role of pyroptosis in cardiovascular diseases including atherosclerosis, coronary heart disease, myocardial infarction, diabetic cardiomyopathy, pressure overload-induced ventricular remodeling and cardiac hypertrophy, myocarditis, arrhythmia and so on, and summarize the potential treatment targeting pyroptosis. It will provide the basis for prevention and treatment of clinical cardiovascular diseases.

Key words: pyroptosis; Gasdermin; caspase; inflammasome; cardiovascular disease

细胞死亡是各种细胞生命历程的最后阶段, 与各种疾病的发生和发展密切相关。随着研究手段的不断发展, 有关细胞死亡方式的研究也逐步深入。细胞死亡方式包括程序性细胞死亡和非程序性细胞死亡, 程序性细胞死亡方式包括凋亡 (apoptosis)、

自噬 (autophagy)、焦亡 (pyroptosis)、程序性坏死 (necroptosis) 等, 非程序性细胞死亡主要指细胞坏死^[1]。近年研究报道, 细胞焦亡参与机体多个脏器多种疾病的发生和发展, 在心血管疾病中亦发挥重要作用。本文比较了细胞焦亡与其他程序性细胞死

Received 2020-04-20 Accepted 2020-08-17

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81770297) and the Scientific Research and Innovation Team of Bengbu Medical College, China (No. Byycx1901).

*Corresponding author. E-mail: bbmcgq@126.com

亡的区别, 重点介绍了细胞焦亡的主要发生机制, 包括细胞焦亡的信号识别、细胞焦亡发生过程中的主要参与者——炎症小体 (inflammasome)、caspase 家族和 Gasdermin 在焦亡中的主要作用, 深入分析了细胞焦亡与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS)、冠心病 (coronary heart disease, CHD)、心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 和再灌注损伤、糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM)、压力超负荷所致的心室重构、心肌炎、心律失常等多种心血管疾病的 关系, 并探讨了靶向细胞焦亡治疗心血管疾病的潜在治疗方法, 以期为临床心血管疾病的防治研究提供基础。

1 细胞焦亡概述及与其他程序性细胞死亡方式的比较

细胞焦亡又称细胞炎性坏死, 于 2000 年首次在沙门氏菌引起的巨噬细胞死亡中被观察到^[2]。Cookson 和 Brennan 等在 2001 年观察到细菌感染的巨噬细胞经历了依赖 caspase-1 活性的快速裂解所引起的细胞死亡, 将这种死亡方式命名为焦亡^[3]。焦亡是与炎症反应密切相关的程序性细胞死亡的重要方式之一, 主要依赖于 caspase 家族中人 caspase-1/4/5 和鼠 caspase-1/11 等促炎性蛋白酶活性^[4], 介导凋亡的 caspase-3 亦能够诱导焦亡的发生^[5,6]。焦亡发生时, 细胞核保持其完整性, 染色体 DNA 出现降解且在 TUNEL 测定中显示阳性, 这与凋亡相似, 但是焦亡细胞的 DNA 降解程度和 TUNEL 染色强度没有凋亡高, 且不会发生 DNA 梯度断裂和 DNA 酶抑制剂的降解。焦亡与其他死亡方式最显著的区别在于, 焦亡快速引起质膜破裂, 细胞膨胀, 细胞膜溶解破裂, 释放细胞内容物和大量炎性因子, 并对邻近细胞发出促炎信号, 募集炎症细胞, 诱发炎症反应。

程序性细胞死亡包括多种类型。细胞凋亡是通过细胞内基因及其产物调控而发生的一种程序性细胞死亡方式, 通常依赖于 caspase 家族中 caspase-3/7/9 等非炎性蛋白酶的活性, 使细胞内 DNA 降解, 核固缩和核碎裂, 并形成凋亡小体被吞噬细胞吞噬, 但不伴有炎症反应。细胞自噬是一种高度保守的分解代谢过程, 可以调控细胞内大分子的分解代谢, 通过将受损的细胞器和异常蛋白转移到溶酶体中并被溶酶体降解, 产生新的代谢底物, 维持细胞内能量供给和生物合成的平衡, 维持细胞内稳态。程序

性坏死是一种促炎性的可“受控”的程序性细胞死亡方式, 过程中伴有大量细胞内容物的释放, 主要由肿瘤坏死因子受体家族或 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 家族调控启动。几种程序性细胞死亡方式比较见表 1。

2 细胞焦亡的发生机制

2.1 细胞焦亡信号的识别

当病原体入侵宿主细胞时, 模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 能够识别病毒的核酸、细菌的细胞壁成分等病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 和内源性损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 与特定配体结合, 再与其他蛋白结合形成多聚体蛋白复合物——炎症小体。PRRs 包括 NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR)、TLR 和 C 型血凝素受体 (C-type lectins receptor, CLR), 其中 TLR 和 CLR 识别 PAMPs, NLR 识别 PAMPs 和 DAMPs。NLR 在识别引入宿主细胞胞质溶胶中的危险信号中发挥作用, TLR 启动信号级联反应, 激活细胞并产生炎性细胞因子, 如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-8 和 I 型干扰素 (interferon, IFN) 信号等。

2.2 炎症小体和 caspase 家族

2.2.1 炎症小体

炎症小体复合物作为下游 caspase 的激活平台, 在焦亡发生中发挥重要作用。参与焦亡的炎症小体主要有: NLRs 家族、PYHIN200 家族成员 AIM2 和 TRIM 家族成员 Pyrin^[7-9]。NLRs 家族成员较多, 包括 NLRP3、NLRP1、NLRP6、NLRC4 等, 主要由 C 端的富含亮氨酸的重复序列 (leucine rich repeat, LRR)、核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD/NACHT) 以及 N 端的 caspase 激活和募集结构域 (caspase activation and recruitment domain, CARD) 或热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD) 组成。NOD/NACHT 负责信号转导复合物的 ATP 依赖性激活, CARD 或 PYD 介导同型蛋白-蛋白相互作用。AIM2 的 N 端含有 PYD 信号域, C 端含有负责结合 DNA 的 HIN200 结构域。Pyrin 由 PYD、锌指结构域 (bBOX)、卷曲螺旋结构域 (coiled-coil, CC) 和 B30.2/SPRY 结构域 (小鼠缺少此域) 组成, 如图 1。

NLRP3 (也称 NALP3) 炎症小体是目前最受关

表1. 几种程序性细胞死亡方式比较

Table 1. Comparison of several forms of programmed cell death

	Pyroptosis	Apoptosis	Autophagy	Necroptosis
Common point	Programmed cell death			
Inducement	Pathological stimulation	Gene regulation in physiological condition	Nutritional deficiency or hormone induction	Pathological changes or severe damage
Cell morphology	Cell expansion and deformation, cell membrane rupture and organelle deformation	Cell shrink, complete organelles and membrane structure, forming apoptotic bodies	Cell produces vacuoles, cell membrane structure is complete, it is swallowed by autophagosomes, and finally digested by lysosomes	Cell expansion and deformation, cell membrane rupture and organelle deformation or swelling
DNA changes	Random degradation	Degradation into 180–200 bp and its multiple fragments	Random degradation	Random degradation
Inflammation	Related to inflammation closely	No inflammation	No inflammation	Related to inflammation closely
Key signal molecules	ASC, caspase-1/11/4/5, IL-18/1 β , Gasdermin	BAK, BAX, caspase-8/7/9/3	LC3, Beclin-1, p62, ATG5, ATG7, ATG12	RIPK1, RIPK3, MLKL
Molecular markers	Gasdermin	Caspase-3/7	LC3, Beclin-1, p62	MLKL

BAK: Bcl-2 antagonist or killer; BAX: Bcl-2-associated X; caspase: cysteine aspartate protease; ATG: autophagy related protein; ASC: apoptosis-associated speck-like protein CARD; RIPK: receptor-interacting serine/threonine protein kinase; MLKL: mixed lineage kinase domain-like pseudokinase.

注的、研究最多的炎症小体，可以被真菌、细菌、病毒以及溶酶体、ATP 等一系列刺激物激活，但这些分子很少直接激活 NLRP3 活性，往往先引起某种共同的细胞自身变化激活 NLRP3 活性，如钾离子外流、氧化线粒体 DNA 的释放^[10]、真核细胞产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 使溶酶体损伤释放溶酶体蛋白酶、线粒体功能障碍、胞内钙离子交换^[11]、细胞膜上孔道形成等，其中钾离子外流是细菌毒素和微粒物质导致 NLRP3 炎症小体激活的常见诱因，钾离子外流导致 NIMA 相关激酶 7 (NIMA-related kinase 7, NEK7) 与 NLRP3 结合，触发 NLRP3 寡聚激活^[12]。

NLRs 其他成员，NLRP1 可被炭疽致死毒素激活；NLRP6 可被牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 和胆汁酸衍生牛磺酸类等微生物及其代谢产物激活；NLRP9 在肠道上皮细胞中特异性表达，可通过 Dhx9 识别短双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)；NLRC4 通过与 NLR 家族神经元凋亡抑制蛋白 (neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP) 的成员如 NAIP1、NAIP2 和 NAIP5/6 结合形成炎症小体。其他类型的炎症小体，AIM2 可通过特异性与胞质 dsDNA 结合被激活；Pyrin 可通过感受病原体 and 宿主细胞中失活的 RhoA 使自身去磷酸化释放 14-3-3 蛋白，引起 Pyrin 活化 (图 1)。

2.2.2 Caspase 家族

Caspase 是一类高度保守的半胱氨酸蛋白酶，在免疫细胞和非免疫细胞中均有表达，可以被大分子信号复合物激活和蛋白水解，裂解其靶向蛋白，最终导致细胞程序性死亡，但细胞死亡的性质由所涉及的特异 caspase 性质决定。哺乳动物 caspase 根据功能差异分为两大类：凋亡和炎性 caspase。凋亡 caspase 主要功能是启动和执行细胞凋亡，启动 caspase 包括 caspase-2/8/9/10，效应 caspase 包括 caspase-3/6/7，而炎性 caspase 包括 caspase-1/4/5/11 和 -12^[13]。Caspase-2、-6、-12 和 -14 的特征尚不清楚，需要进一步的研究。细胞焦亡由炎性 caspase-1/4/5/11 特异性切割 Gasdermin D (GSDMD) 引发^[14]，细胞受到不同刺激时，所诱导的焦亡通路不同，分为依赖于 caspase-1 的经典焦亡通路和依赖于 caspase-4/5/11 的非经典通路。

2.2.2.1 依赖 caspase-1 的细胞焦亡经典通路

NLRP3/6/1/9、AIM2 和 Pyrin 等炎症小体被各种因素激活后，PYD 结构域与衔接蛋白凋亡相关微粒蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein CARD, ASC) 的 N 端 PYD 同源区域通过蛋白-蛋白相互作用结合激活 ASC 蛋白，ASC 的 C 端 CARD 结构域与 pro-caspase-1 的 N 端 CARD 结构域相互结合募集 pro-caspase-1，形成炎症小体复合物，促进 pro-caspase-1 自身发生寡聚化，并水解为 p20 (20 kDa) 和 p10 (10

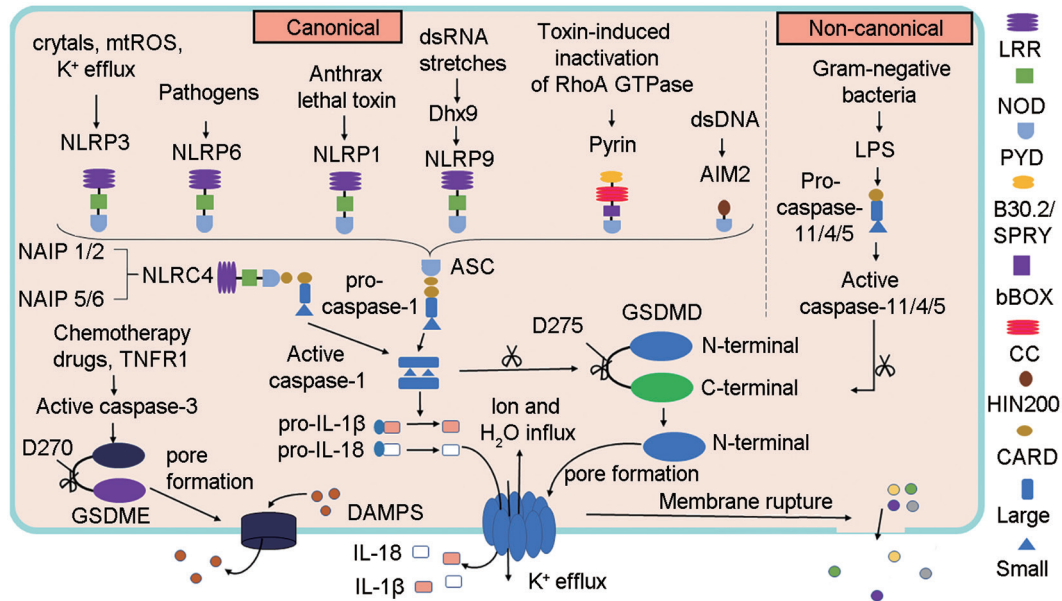


图 1. 细胞焦亡发生示意图

Fig. 1. Schematic diagram of pyroptosis. In the canonical caspase-1 pathway, the NLRs (NLRP3, NLRP6, NLRP1 and NLRP9), Pyrin and AIM2 are activated by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs), and then via homotypic interactions of the PYD domain bind to ASC, which recruits pro-caspase-1 through the CARD domain. NLRC4 directly recruits to pro-caspase-1 through its own CARD domain. Then, the recruited pro-caspase-1 is catalytically cleaved to generate active caspase-1. Active caspase-1 promotes the inflammatory cytokines pro-IL-1 β and pro-IL-18 mature into IL-1 β and IL-18, and simultaneously cleaves the D275 of the GSDMD C-terminal and N-terminal junction regions to release the active N-terminal, consequently, a GSDMD pore is formed in the cell membrane. In the non-canonical pathway of pyroptosis, pro-caspase-11/4/5 is activated to form caspase-11/4/5 via directly detecting cytosolic lipopolysaccharide (LPS), and then triggers pyroptosis by directly cleaving GSDMD. Inflammatory factors such as IL-18 and IL-1 β are released from the pore, while K⁺ efflux, ions and water influx. Once the cell volume gradually increases beyond the cell compensation capacity, the cell contents such as HMGB-1, IL-1 α , LDH and ATP were released from the ruptured cell membrane and cause inflammation. Activated caspase-3 can also shift the classical apoptosis to pyroptosis by chemotherapeutic drugs and TNFR1 to cleave the D270 of the GSDME connection area to form a GSDME pore in the cell membrane, then release DAMPs and other contents. LRR: leucine rich repeat; NOD/NACHT: nucleotide-binding oligomerization domain; CARD: caspase activation and recruitment domain; PYD: pyrin domain; CC: coiled-coil; bBOX: zinc finger domain; ASC: apoptosis-associated speck-like protein CARD; GSDMD: Gasdermin D; Large: large catalytic subunit; Small: small catalytic subunit.

kDa) 两个亚基^[15], 形成 caspase-1。Caspase-1 促进缺乏分泌信号肽的 IL-1 β 和 IL-18 的前体 pro-IL-1 β /18 活化为成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[16]; caspase-1 同时切割 GSDMD 蛋白, 在细胞膜上形成孔隙, 释放 IL-18、IL-1 β 等炎症细胞因子, 发生炎症反应 (图 1)。

对于本身含有 CARD 结构域的 NLRC4, 可直接与 pro-caspase-1 通过 CARD-CARD 相互作用形成具有活性的 caspase-1, 诱导焦亡。

2.2.2.2 依赖 caspase-4/5/11 的细胞焦亡非经典通路

其他的炎性 caspase-4、-5 和 -11 则不需要炎症小体激活, 他们可以作为直接受体与脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 等病原体编码的分子结合^[17]。

作为革兰氏阴性菌细胞壁的最主要成分, LPS 的类脂 A (lipid A) 结构有 6 条脂肪链, 即“六酰化”的 lipid A, 人 caspase-4/5 或小鼠 caspase-11 的 CARD 结构域的一些碱性残基与“六酰化”结构结合, 发生寡聚化后被激活, 直接切割 GSDMD 蛋白, 释放炎症因子, 发生炎症反应 (图 1)。

此外, 在 caspase-11 与 LPS 特异性结合后, 缝隙连接蛋白 Pannexin-1 跨膜通道开放, 促进 Pannexin-1 活化, ATP 释放并与细胞膜上 P2X 嘌呤受体 7 (P2X7) 结合, 打开非选择性 P2X7 阳性离子通道, 导致 K⁺ 外流, 激活 NLRP3-ASC-caspase-1 通路的焦亡^[18, 19], 导致 IL-1 β 、IL-18 的低水平分泌。

GSDMD 孔道释放的 K^+ 外流也可以通过 NLRP3-ASC-caspase-1 途径诱导 IL-1 β 、IL-18 的分泌, 这是细胞膜损伤的间接结果。

2.3 Gasdermin介导细胞焦亡

Caspase 导致细胞焦亡的原因是他们能够切割和激活能成孔的 Gasdermin 基因家族的特定成员。该家族是一类保守蛋白家族, 大多数都具有成孔活性。Gasdermin 家族中, 人类拥有 GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD、GSDME 和 DFNB59^[20]。小鼠没有 GSDMB, 但有 3 个 GSDMAs (GSDMA1~3) 和 4 个 GSDMCs (GSDMC1~4)。

2.3.1 GSDMD是焦亡的效应物

GSDMD 是 caspase-1、-4、-5 和 -11 的共有底物, 是触发细胞焦亡的关键执行者^[21]。在不同的人体组织和白细胞亚群中广泛表达。在人体中, GSDMD 约含 480 个氨基酸残基, 是由一个含 242 个氨基酸残基 (31 kDa) 的氨基末端结构域 (也称为 N 域或 NT), 通过中间连接器连接到一个含 199 个氨基酸残基 (22 kDa) 的羧基末端结构域 (也称为 C 域或 CT), 其中 N 域具有成孔结构域 (pore-forming domain, PFD), C 域具有抑制成孔的抑制域 (repressor domain, RD), 因此 GSDMD 是一种自抑制构象, 在正常细胞中处于失活状态。

细胞受感染时, caspase 切割 GSDMD 的 N 端和 C 端中间连接器的 caspase 裂解位点 (caspase-1/4/5/11/8 裂解位点在连接区域的 D275 处), N-端被释放出来, PFD 和 RD 分离后选择性结合细胞膜中的脂质, 如哺乳动物细胞质膜内叶中的磷脂酰肌醇磷酸酯、磷脂酰丝氨酸以及细菌细胞膜内外叶中的心磷脂, 但不结合磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱^[22, 23], 继而在膜中组装成弧状或狭缝状的低聚物, 这些低聚物通过募集相同的 16 个前体, 在细胞膜中形成稳定的直径约 10~15 nm 的环状孔隙, 称为 GSDMD 孔^[24], 使成熟的 IL-1 β 、IL-18 (4~8 nm) 等小离子和蛋白质通过, 打破细胞的渗透屏障, 钠、钾浓度梯度破坏, 钠离子和水分大量进入细胞, 导致细胞膨胀、体积增大、细胞膜破裂, 引起胞质内炎症因子和内容物快速大量释出, 焦亡发生^[15]。

细胞膜上出现 GSDMD 孔隙时, 细胞会启动代偿机制来调节体积, 如 K^+ 、 Cl^- 或有机渗透物通道可以输出溶质和水。如果 GSDMD 孔数很少, 不超过代偿机制调节体积的能力, 细胞可以通过正常的膜修复过程去除孔, 不会发生焦亡^[25]。但当 GSDMD

孔隙的数量超过细胞的代偿能力时, 细胞体积超过膜容量, 质膜就会在极度膨胀的细胞中与皮质细胞骨架分离并逐步破裂, 立即释放乳酸脱氢酶等可溶性蛋白质, 但是细胞器仍然保留, 从而发生焦亡。在破裂发生之后, 渗透压平衡, 细胞体积则不继续增加^[24]。

GSDMD 也能被 caspase-3 切割, 但是这种切割发生在 N 末端结构域内 D87 处而不是连接域内, GSDMD 仍处于失活状态, 故而没有发生焦亡^[6]。GSDMD 对凋亡 caspase 并不敏感, 但将 GSDMD 连接域间的裂解位点人为地转变为 caspase-3 的识别位点, 能够将 TNF- α 诱导的凋亡转化为焦亡, 说明 GSDMD 连接域的裂解足以实现焦亡, 也说明焦亡具有比凋亡更快的动力学特性^[14]。

2.3.2 Gasdermin家族其他成员

除 DFNB59 只含有 N 域外, 所有的 Gasdermin 都有类似 GSDMD 的双域自抑制结构, 如 GSDMA/GSDMA3、GSDMB、GSDMC 和 GSDME, 他们的 N 域过表达均可诱导哺乳动物细胞的吞噬作用, 并可杀死细菌, 都能在细胞膜上形成孔道, 导致焦亡^[23]。

GSDME 具有将细胞凋亡转化为焦亡的能力。在化疗药物作用下, DNA 损伤, 凋亡效应因子 caspase-3 被激活, 在 GSDME 表达阴性细胞中诱导凋亡, 但在正常非癌化组织中 GSDME 高水平表达, caspase-3 在 GSDME 连接区域的 D270 处裂解以释放具有活性的 N 端结构域, 诱导焦亡, 发生炎症反应, 这可能是化学疗法副作用的原因之一^[5, 6]。

最近研究表明, 在转化生长因子 β 活化激酶 1 (transforming growth factor β -activated kinase 1, TAK1) 失活时, caspase-8、FAS 相关死亡域 (FAS-associated death domain, FADD) 和与受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1, RIPK1) 活化, 促进 NLRP3 炎症小体激活以及 GSDMD、GSDME 的裂解, 引起焦亡^[26], 嗜中性粒细胞分泌的蛋白酶也可以激活 GSDMD^[27], 所以 Gasdermin 家族不同成员在不同组织中与不同死亡方式的关系及生理学功能还有待研究。

3 细胞焦亡和心血管疾病

心血管疾病是全球死亡的主要病因之一, 焦亡和 NLRP3 等炎症小体在各种心血管疾病的病理发生和发展过程中起着关键作用, 如 AS、MI、冠状动脉综合征和其他非缺血性心脏病如 DCM、慢性

心力衰竭和心脏功能障碍^[28, 29]。本文重点关注细胞焦亡与心血管疾病之间的关系。

3.1 AS

AS 是一种慢性进行性疾病，其主要特征是主动脉壁脂质积累、炎性细胞浸润。动脉血管壁的细胞焦亡主要涉及血管内皮细胞 (endothelial cell, EC)、平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 和巨噬细胞，这些细胞发生焦亡时通过释放促炎因子和改变斑块的稳定性参与 AS 的发生^[30]。

EC 是血液和血管壁之间的屏障，其焦亡主要参与了 AS 的早期阶段。高血脂、高血糖、高血压、吸烟等危险因素均可引起 EC 功能障碍。高脂血症通过 NADPH 氧化酶依赖性途径诱导 ROS 产生，激活 NLRP3-caspase-1 或通过 caspase-1-sirtuin-1 激活蛋白 -1 途径激活 caspase-1，引起 EC 焦亡，释放 IL-1 β /18 等促炎性细胞因子，引起血管炎症发生^[31]。同时，焦亡也增加了 EC 黏附分子的表达水平，如细胞黏附分子 1 和血管黏附分子 1，触发单核细胞募集并黏附于 EC，逐步迁移到血管内皮下成为巨噬细胞，吞噬组织中富含胆固醇的脂蛋白，形成泡沫细胞，并开始形成脂肪条纹^[32]。在 caspase-1 和载脂蛋白 E 双基因敲除小鼠模型中，单核细胞的募集受到抑制，黏附分子表达、炎性细胞因子分泌均下降^[33]，这为 AS 的靶点药物提供了新见解。线粒体来源的活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 是细胞 ROS 的主要来源，过量的 mtROS 与人类和小鼠 AS 进展均有关^[34]。尼古丁、丙烯醛和镉等通过产生 mtROS 激活 NLRP3 炎症小体，触发 EC 经典通路的焦亡，诱发 AS 的发生^[35-37]。微小 RNA (microRNA, miR) 是一种内源性、小的非编码 RNA，长度约为 22 个核苷酸，氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 通过 miR-125a-5p 下调 tet 甲基胞嘧啶双加氧酶 2，活化 NF- κ B 并导致 DNA 异常甲基化、线粒体功能障碍、ROS 生成，激活 NLRP3，诱导 EC 发生焦亡，发生炎症，促进 AS 形成^[38]。

VSMC 通过表型和功能转变参与血管损伤的修复。在 AS 的慢性炎症中，动脉 VSMC 的表型和功能异常，导致 VSMC 分化，产生胶原蛋白和弹性蛋白等细胞外基质，参与纤维帽的组成，构成 AS 斑。VSMC 的焦亡会导致纤维帽脆弱而不稳定，诱发急性冠状动脉综合征^[39]。EC 的数量减少和完整性降低引起内皮层通透性增加，促进 VSMC 迁移和沉积。

在 VSMC 中，ox-LDL 诱导 AIM2-ASC-caspase-1 途径的焦亡和 DNA 断裂。载脂蛋白 E 基因敲除的高脂血症小鼠中，AIM2 过度表达导致斑块病变面积增加，TUNEL 阳性细胞和巨噬细胞数量增加，说明 AIM2 炎症小体参与 VSMC 的焦亡^[40]，进而释放促炎细胞因子，导致炎症发生，胶原蛋白破坏、基质纤维帽变薄，加剧了 AS 发生和斑块的不稳定性。

巨噬细胞的焦亡导致生长因子、细胞因子、蛋白酶和脂质等释放，诱导炎症反应，促进斑块破裂和血栓形成，导致急性心血管疾病。人类巨噬细胞中，ox-LDL 和胆固醇晶体诱导 NLRP3-caspase-1 途径的焦亡^[41]，产生细胞因子和基质金属蛋白酶，引起强烈的炎症反应，并诱导泡沫细胞的焦亡，促进了晚期 AS 病变中被纤维帽覆盖的坏死核心的形成和纤维斑块的不稳定，导致血管栓塞和组织梗死^[42]。甘油三酯也是 AS 危险因素，可以引发焦亡并加重疾病进程^[43]。IL-1 家族的 IL-1 β 是重要的促炎性细胞因子，主要由活化的巨噬细胞产生，参与炎症反应和免疫反应的启动。与载脂蛋白 E 基因敲除的小鼠相比，缺乏 IL-1 β 的小鼠 AS 斑块面积减少^[44]。

3.2 CHD

晚期冠状动脉粥样硬化巨噬细胞的死亡会导致 CHD 的发生和发展^[45]。CHD 大鼠模型中，miR-22 通过靶向抑制 NLRP3 炎症小体信号通路发挥对 EC 损伤的保护作用^[46]。与对照组相比，稳定型心绞痛和急性 MI 患者外周血单核细胞 (peripheral blood monocytes, PBMC) 中，NLRP3、IL-18、IL-1 β 的表达增加，瑞舒伐他汀可以通过下调 NLRP3 及其下游介质表达减轻 CHD 的炎症过程，表明 NLRP3 在 CHD 的发病机制中发挥潜在作用^[47, 48]。尿酸单钠晶体也通过激活 NLRP3 炎症小体增加痛风相关的 CHD 风险^[49]。

3.3 MI和再灌注损伤

MI 是一种由于缺血和氧供需不平衡导致心肌死亡的临床综合征，可引起左心室泵功能恶化，导致心力衰竭。急性 MI 发作后，缺血性损伤以及细胞死亡后的细胞碎片和代谢产物会作为 DAMPs 激活炎症小体，导致炎症反应发生^[50]。再灌注治疗可减少缺血性损伤和梗死面积，提高患者的生存率，但心肌再灌注后，由于线粒体损伤、ROS 水平升高、细胞离子稳态失调等，会诱发明显的组织破坏和无菌性炎症反应^[51, 52]，导致嗜中性粒细胞和巨噬细胞

积聚，随后伤口吸收、瘢痕形成。积聚的白细胞同时释放炎症细胞因子、趋化因子和蛋白酶，进一步加剧炎症并促进 MI 后心肌损伤和重塑。

NLRP3 炎症小体在 MI 中发挥重要作用，如缺氧 / 复氧和细胞外 ATP 刺激心肌细胞生成 P2X7 和 ROS 诱导 K^+ 外排，导致 NLRP3 炎症小体在 MI 中激活^[53]。Mezzaroma 等观察到急性心肌缺血的小鼠心脏中 caspase-1 以及疤痕组织和心肌梗死区附近胞浆内 ASC、NLRP3 和 caspase-1 活性均升高。抑制 P2X7 和 NLRP3 则抑制炎症小体复合物形成，限制急性 MI 后梗死面积和心脏的扩大^[54]。Lei 等观察到，在心肌细胞中抑制 ROS 可降低 NF- κ B 和 GSDMD 的活性，表明在 MI 中，ROS 通过 NF- κ B-GSDMD 信号通路介导心肌细胞焦亡^[55]。

在缺血 / 再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 小鼠损伤模型中，随着细胞内 ROS 浓度的增加，硫氧还蛋白相互作用蛋白 (thioredoxin interacting protein TXNIP) 与硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 复合物解离后与 NLRP3 的 LRR 区结合，活化 NLRP3，心肌内注射 TXNIP siRNA 可减少心肌 I/R 小鼠的梗死面积，抑制 NLRP3 的活化，表明 TXNIP 和 NLRP3 在缺血心脏中发挥作用^[56]。大鼠 MI 后，M1 巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体通过磷脂酶 C-肌醇磷酸 3 途径促进心脏成纤维细胞表型转化、增加胶原蛋白和细胞外基质的分泌，加速心脏重构^[57]。除心肌细胞外，Sandanger 等观察到 MI 后左心室心肌成纤维细胞 NLRP3、IL-1、IL-18 mRNA 水平也明显升高^[58]，说明多种细胞的焦亡参与缺血性损伤。

3.4 DCM

DCM 是糖尿病的主要并发症之一，也是引起糖尿病患者死亡的主要原因之一，其主要特征是心脏结构和功能受损，包括心肌细胞死亡、心脏成纤维细胞活化以及左心功能不全和代谢异常。其中，心肌细胞和成纤维细胞的死亡是 DCM 的根本变化，可引发心脏重塑和左心室功能障碍。

本研究组前期研究观察到高表达线粒体乙醛脱氢酶 2 可以通过抑制 NLRP3 炎症小体通路而减轻高糖诱导的 H9C2 心肌细胞的毒性反应^[59]。Luo 等研究表明，沉默 NLRP3 或抑制 ROS 可抑制高糖诱导的 H9C2 心肌细胞焦亡^[60]。Jeyabal 等观察到在高血糖状态下，人心室心肌细胞中的 caspase-1、IL-1 和 ELAV 样蛋白 1 (ELAV-like protein 1, ELAVL1) 表达增加，介导 TNF- α 诱导的心肌细胞焦亡。ELAVL1

是 miR-9 的靶基因，抑制 miR-9 会增加 ELAVL1 的表达并激活 caspase-1。在高糖损伤的心肌细胞中，敲除 ELAVL1 或转染 miR-9 mimic 可降低 caspase-1 和 IL-1 β 的表达，抑制焦亡，表明靶向 miR-9 或 ELAVL1 可能成为 DCM 的潜在治疗策略^[61]。Li 等研究显示，在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠心脏和高糖损伤的心肌细胞中，miR-30d 表达显著增加，并可以通过 foxo3a/CARD/caspase-1/IL-1 β /18 途径介导心肌细胞焦亡^[62]。

心脏纤维化是 DCM 的主要病理特征之一，心肌成纤维细胞在此过程中起着重要的作用，是有吸引力的潜在治疗靶点。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长度大于 200 个核苷酸、非编码蛋白的 RNA 类型。KCNQ1 相反链 / 反义转录本 1 (KCNQ1 opposite strand/anti-sense transcript 1, Kcnqlot1) 是位于人类 11p15.5 号染色体上的 lncRNA。Kcnqlot1 参与各种心血管疾病的发生，包括急性心肌损伤^[63] 和心律不齐^[64] 等。Yang 等观察到在 DCM 中，心脏成纤维细胞中 Kcnqlot1 被活化，诱导细胞焦亡，Kcnqlot1 可以充当竞争性内源 RNA，通过 miR-214-3p 调节 caspase-1 的表达^[65]。用 siRNA 敲低 Kcnqlot1 抑制了高糖损伤的心脏成纤维细胞中 caspase-1 的活性、GSDMD 的裂解和 IL-1 β 的分泌，并抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路^[66]。因此在 DCM 中，除了已知的炎症小体以外，非编码 RNA 也可能介导 caspase-1 通路的焦亡，可能是潜在的治疗靶点。Zhang 等研究显示，新生大鼠心肌成纤维细胞中，活性肽 H3 松弛素通过降低 ROS 和 P2X7 受体诱导的 NLRP3 炎症小体抑制高糖诱导的胶原蛋白合成，从而减轻 DCM 中的心脏纤维化^[67]。

3.5 压力超负荷所致的心室重构

高血压是心力衰竭等心血管事件的独立危险因素，压力超负荷所致的心室重构和心脏肥大是高血压的常见并发症。NLRP3 炎症小体参与压力超负荷所致的心脏重塑和心脏肥大等病理变化。

心脏重塑的特征是心脏结构、形状和功能的改变，是维持心脏功能的适应性改变，但持续的压力会导致适应性反应超载，最终导致心脏衰竭。与心肌细胞中 Ca^{2+} 或钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II δ (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ , CaMKII δ) 信号引起压力超负荷、NF- κ B 和 NLRP3 活化的横向主动脉缩窄的对照组小鼠相比，选择性敲除 CaMKII δ 基因的小鼠心脏中巨噬细胞聚集减少，超

负荷压力诱导的纤维化和功能障碍减轻^[68]。此外, 缺乏 NLRP3 会加速心脏重塑小鼠的心脏肥大、纤维化和超负荷压力引起的炎症反应; 也会增加 TLR4 表达水平, 导致不良的心脏重塑^[69]。

心脏肥大最常见原因是肥厚型心肌病、长期不受控制的收缩期高血压和心脏瓣膜狭窄。心脏肥大是对压力超负荷的初始适应性反应, 但持续的压力超负荷通常会导致心力衰竭, 甚至猝死, 导致患者预后不良。焦亡相关因子在心脏肥大反应中发挥关键作用。IL-18 基因敲除小鼠心脏肥大相关基因表达下调^[70]。在主动脉缩窄的兔模型中, IL-18 表达在压力超负荷期间显著增加^[71]。Li 等研究证实, 横向主动脉缩窄诱发的高血压 C57/BL6 小鼠中 NLRP3 水平显著升高, 并参与炎症介质和纤维化因子的产生, 导致心肌纤维化、心肌肥大和心脏功能受损^[72]。在 H9C2 心肌细胞中, NF- κ B、NLRP3 和晚期糖基化终产物受体 (receptor of advanced glycation end-products, RAGE) 通过 RAGE-NF- κ B-NLRP3-IL-1 β 信号通路诱导心肌肥大^[73]。肥大型心肌细胞中 caspase-1 和 IL-1 β 的表达水平均显著上调, 而抑制 caspase-1 可以减轻血管紧张素 II 诱导的心肌肥大^[44]。心肌细胞的 ROS 系统被激活后, 累积的 ROS 和 Ca²⁺ 释放到细胞质中, 线粒体膜电位发生变化, 导致心肌细胞焦亡^[74], 而吡非尼酮可通过抑制 NLRP3 炎症小体组装和调节 ROS 依赖的 NLRP3-IL-1 β 信号传导改善横向主动脉缩窄小鼠的左室肥大和心肌纤维化^[75]。

3.6 心肌炎

Liu 等报道胆钙素胆固醇乳剂通过下调焦亡相关信号改善了自身免疫性心肌炎^[76]。Wang 等报道, 组织蛋白酶 B 通过激活炎症小体促进细胞焦亡从而加剧了柯萨奇病毒 B3 诱导的病毒性心肌炎^[77, 78]。这些报道证实了细胞焦亡参与心肌炎过程, 抑制焦亡信号通路可能是对抗心肌炎的可行策略。

3.7 心律失常

心力衰竭患者心脏常会出现电重构现象, 导致心律失常的发生。糖尿病小鼠心脏巨噬细胞中的 TLR2 和 NLRP3 炎症小体激活, 诱导 IL-1 β 的产生, 使 L 型 Ca²⁺ 电流 (I_{CaL}) 密度降低、ROS 和蛋白激酶 C 活化, 促进心律失常和心力衰竭的发展^[79]。在心力衰竭期间, 持续的炎症刺激导致胶原蛋白积聚和心肌纤维化, 心肌成纤维细胞诱导炎症介质产生, 形成恶性循环^[80]。

4 靶向细胞焦亡治疗心血管疾病的潜在治疗方法

细胞焦亡在心血管疾病中的关键作用促进了靶向焦亡通路相关蛋白的药物治疗心血管疾病的研究, 如 NLRP3、caspase-1、GSDMD、IL-1 家族等的特异性抑制剂或药物。

秋水仙碱、格列本脲衍生物、MCC950、INF4E、Dapansutril/OLT1177、16673-34-0 和 CY-09 等药物可以通过抑制 ATPase 活性、阻止 P2X7 通道开放、防止 NLRP3 寡聚或影响 NACHT 结构域中的 ATP/dATP 结合、干扰 ASC 聚合和炎症小体复合物组装等机制抑制 NLRP3 活性^[50, 81, 82]。其中 MCC950 和 CY-09 对 NLRP3 炎症小体具有选择性, 不能抑制 NLRP1 和 NLRP4 等其他炎症小体, 也不会影响其他免疫应答^[83]。MCC950 具有预防 NLRP3 相关疾病的潜力, 如小血管疾病、糖尿病引起的中风^[84]、高血压、肾脏疾病^[82] 和心血管疾病^[85]。CY-09 通过抑制 NLRP3 活性减少血小板聚集以止血和防止动脉血栓形成^[86]。小鼠 MI 后, 秋水仙碱可以通过抑制 NLRP3 炎症小体、caspase-1 以及 MMP2 和 MMP9 表达而减少梗死区域的急性炎症, 预防心力衰竭, 减少心室重构, 并保持心脏功能的稳定性, 改善存活率^[87]。心肌 I/R 的大鼠模型中, 秋水仙碱能够降低梗死区域 IL-1 β 水平, 减轻炎症^[88]。

除上述直接影响 NLRP3 的药物外, 还有其他药物和分子可间接抑制 NLRP3 活性。褪黑素是一种抗氧化剂, 具有抗 AS 作用, 可减弱高脂饮食的载脂蛋白 E 敲除小鼠主动脉内皮中焦亡相关因子的表达, 包括 NLRP3、ASC、caspase-1、GSDMD 和 IL-18/1 β , 褪黑素治疗 12 周可显著降低 AS 斑块和脂质含量。Zhang 等报道褪黑素在 AS 中通过降低 MEG3/miR-223/NLRP3 信号轴中焦亡相关蛋白水平, 抑制 EC 焦亡^[89]。Li 等报道 MicroRNA-30c-5p 通过下调 FOXO3 也可以抑制依赖 NLRP3 的 AS 中 EC 的焦亡^[90]。他汀类药物可以降低冠状动脉疾病中 NLRP3 炎症小体和下游 IL-1 β /18 的表达, 对内皮功能障碍具有抑制作用。Chen 等观察到利拉鲁肽通过下调 H9C2 细胞中的 SIRT1/NOX4/ROS 途径减轻 NLRP3 炎症小体介导的焦亡^[91]。

此外, 在急性 MI 的兔模型中, 色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF) 通过其受体或非依赖钙的磷脂酶 A2 (calcium-independent phospholipase A2, iPLA2) 抑制线粒体分裂, 使 NLRP3

炎症小体失活, 这表明 PEDF 也可以用于治疗缺血性疾病, 包括急性 MI 和心肌 I/R 损伤^[92]。在 I/R 小鼠中, 黄酮可以减少氧化应激、抑制 NLRP3 炎症小体活化、减少炎症和细胞死亡, 对 I/R 具有积极的治疗作用^[93]。低剂量雷公藤内酯醇通过阻断 NLRP3 炎症小体复合物的组装改善由异丙肾上腺素(体内)或血管紧张素 II(体外)诱导的小鼠心脏纤维化和心脏肥大, 并抑制 NLRP3-TGF- β 1-Smad 途径激活^[53, 94]。上述研究为 NLRP3 炎症小体相关的心血管疾病提供了潜在治疗策略。

Caspase-1 抑制剂也可以减轻细胞焦亡, 如 VX-765、Ac-WEHD-CHO、ac-YVAD-cmk 和 Pralnacasan。其中, VX-765 广泛用于抑制心血管疾病中的焦亡, VX-765 通过抑制 caspase-1 降低 I/R 损伤中的心肌梗死面积并保持心室功能^[95, 96]。以上研究表明抑制 caspase-1 是治疗由焦亡引发的心血管疾病的潜在方法。

GSDMD 是焦亡的執行者, 抑制 GSDMD 孔的形成同样发挥心肌保护作用。小分子抑制剂坏死磷酰胺(NSA)直接与 GSDMD 结合而抑制 p30-GSDMD 的寡聚化, 阻碍单核或巨噬细胞中的焦亡和 IL-1 分泌, 但 NSA 不抑制其他先天免疫途径, 如 TLR 途径和依赖 GSDME 的细胞死亡, 也不干扰炎症小体的形成^[97]。双硫仑和 Bay 11-7082 通过共价修饰保守的半胱氨酸(小鼠 Cys192/人 Cys191)也可以阻断 GSDMD 孔和焦亡的形成^[98]。以上研究表明靶向 GSDMD 的药物可以治疗细胞焦亡相关的疾病。

IL-1 相关药物也在心血管疾病中发挥作用。2017 年, Canakinumab 抗炎性血栓形成结果研究(CANTOS)的临床试验结果显示, 与安慰剂组相比, 接受 Canakinumab 患者的 IL-1 相关基因的表达被抑制, 高敏 C 反应蛋白降低, 而低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯的变化不显著, 说明 Canakinumab 通过靶向 IL-1 β 蛋白降低了心血管疾病发生率, 但不能降低血脂水平^[99]。

5 结论与展望

近年来, 细胞焦亡在心血管疾病中的作用研究已取得较大的进展。在心血管系统中, EC 的焦亡促进 AS 的发展和脂质沉积; VSMC 的焦亡引起 AS 斑块不稳定; 单核细胞/巨噬细胞的焦亡加剧炎症反应, 促进 AS 和 MI 的发展。焦亡其他相关因

子如 AIM2、Pyrin、caspase-1、IL-1 β 等均在心血管疾病的发生和发展中发挥重要作用。但是目前细胞焦亡在疾病发病中的具体机制以及分子调控尚未完全清楚, 因此细胞焦亡发生的分子机制和调控手段有待进一步深入研究, 这将有助于我们找到细胞焦亡相关的疾病治疗靶点, 为临床相关疾病的诊断和治疗提供新思路。

参考文献

- 1 Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 2019; 29(5): 347–364.
- 2 Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 2000; 38(1): 31–40.
- 3 Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 2001; 9(3): 113–114.
- 4 Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Walle LV, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011; 479(7371): 117–121.
- 5 Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, Wang K, Shao F. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature* 2017; 547(7661): 99–103.
- 6 Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat Commun* 2017; 8: 14128.
- 7 Torre-Minguela Cd, Castillo PMd, Pelegrín P. The NLRP3 and Pyrin inflammasomes implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Front Immunol* 2017; 8: 43.
- 8 Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 2010; 11(5): 395–402.
- 9 Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. *Eur J Immunol* 2018; 48(2): 230–238.
- 10 Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012; 36(3): 401–414.
- 11 Lee GS, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, Germain RN, Kastner DL, Chae

- JJ. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature* 2012; 492(7427): 123–127.
- 12 Chen X, Liu G, Yuan Y, Wu G, Wang S, Yuan L. NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF-kappaB signaling. *Cell Death Dis* 2019; 10(12): 906.
- 13 Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti TD. Caspases in cell death, inflammation, and Gasdermin-induced pyroptosis. *Annu Rev Immunol* 2020; 38: 567–595.
- 14 Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526(7575): 660–665.
- 15 Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ, Yap AS, Bezbradica JS, Schroder K. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med* 2018; 215(3): 827–840.
- 16 Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The pore-forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity* 2018; 48(1): 35–44.e6.
- 17 Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 2014; 514(7521): 187–192.
- 18 Rühl S, Broz P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K^+ efflux. *Eur J Immunol* 2015; 45(10): 2927–2936.
- 19 Yang D, He Y, Munoz-Planillo R, Liu Q, Nunez G. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. *Immunity* 2015; 43(5): 923–932.
- 20 Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: effectors of pyroptosis. *Trends Cell Biol* 2017; 27(9): 673–684.
- 21 He WT, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang ZH, Zhong CQ, Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res* 2015; 25(12): 1285–1298.
- 22 Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 2016; 535(7610): 153–158.
- 23 Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, Sun H, Wang DC, Shao F. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 2016; 535(7610): 111–116.
- 24 Mulvihill E, Sborgi L, Mari SA, Pfreundschuh M, Hiller S, Muller DJ. Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *EMBO J* 2018; 37(14): e98321.
- 25 Schneider KS, Gross CJ, Dreier RF, Saller BS, Mishra R, Gorka O, Heilig R, Meunier E, Dick MS, Cikovic T, Sodenkamp J, Medard G, Naumann R, Ruland J, Kuster B, Broz P, Gross O. The inflammasome drives GSDMD-independent secondary pyroptosis and IL-1 release in the absence of caspase-1 protease activity. *Cell Rep* 2017; 21(13): 3846–3859.
- 26 Orning P, Weng D, Starheim K, Ratner D. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. *Science* 2018; 362(6418): 1064–1069.
- 27 Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Lucrezia RD, Kordes S, Menninger S, Eickhoff J, Nussbaumer P, Klebl B, Krüger R, Herzig A, Zychlinsky A. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol* 2018; 3(26): eaar6689.
- 28 Jia C, Chen H, Zhang J, Zhou K, Zhuge Y, Niu C, Qiu J, Rong X, Shi Z, Xiao J, Shi Y, Chu M. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases. *Int Immunopharmacol* 2019; 67: 311–318.
- 29 An N, Gao Y, Si Z, Zhang H, Wang L, Tian C, Yuan M, Yang X, Li X, Shang H, Xiong X, Xing Y. Regulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasome, a novel immune-inflammatory marker in cardiovascular diseases. *Front Immunol* 2019; 10: 1592.
- 30 Xu Y, Zheng L, Hu Y, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2018; 476: 28–37.
- 31 Yin Y, Li X, Sha X, Xi H, Li YF, Shao Y, Mai J, Virtue A, Lopez-Pastrana J, Meng S, Tilley DG, Monroy MA, Choi ET, Thomas CJ, Jiang X, Wang H, Yang XF. Early hyperlipidemia promotes endothelial activation via a caspase-1-sirtuin 1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(4): 804–816.
- 32 Lopez-Pastrana J, Ferrer LM, Li YF, Xiong X, Xi H, Cueto R, Nelson J, Sha X, Li X, Cannella AL, Imoukhuede PI, Qin X, Choi ET, Wang H, Yang XF. Inhibition of caspase-1 activation in endothelial cells improves angiogenesis: a novel therapeutic potential for ischemia. *J Biol Chem* 2015; 290(28): 17485–17494.
- 33 Menu P, Pellegrin M, Aubert JF, Bouzourene K, Tardivel A, Mazzolai L, Tschopp J. Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis* 2011; 2: e137.
- 34 Wang Y, Tabas I. Emerging roles of mitochondria ROS in atherosclerotic lesions: causation or association? *J Atheroscler Thromb* 2014; 21(5): 381–390.
- 35 Wu X, Zhang H, Qi W, Zhang Y, Li J, Li Z, Lin Y, Bai X, Liu X, Chen X, Yang H, Xu C, Zhanga Y, Yang B. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endo-

- thelial cell pyroptosis. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 171.
- 36 Jiang C, Jiang L, Li Q, Liu X, Zhang T, Dong L, Liu T, Liu L, Hu G, Sun X, Jiang L. Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells. *Toxicology* 2018; 410: 26–40.
- 37 Chen H, Lu Y, Cao Z, Ma Q, Pi H, Fang Y, Yu Z, Hu H, Zhou Z. Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells. *Toxicol Lett* 2016; 246: 7–16.
- 38 Zhaolin Z, Jiaojiao C, Peng W, Yami L, Tingting Z, Jun T, Shiyuan W, Jinyan X, Dangheng W, Zhisheng J, Zuo W. OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway. *J Cell Physiol* 2019; 234(5): 7475–7491.
- 39 Zhang Y, Xie B, Sun L, Chen W, Jiang S, Liu W, Bian F, Tian H, Li R. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the ‘normal region’ of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *J Cell Mol Med* 2016; 20(6): 1049–1061.
- 40 Pan J, Han L, Guo J, Wang X, Liu D, Tian J, Zhang M, An F. AIM2 accelerates the atherosclerotic plaque progressions in ApoE^{-/-} mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498(3): 487–494.
- 41 Lin J, Shou X, Mao X, Dong J, Mohabeer N, Kushwaha KK, Wang L, Su Y, Fang H, Li D. Oxidized low density lipoprotein induced caspase-1 mediated pyroptotic cell death in macrophages: implication in lesion instability? *PLoS One* 2013; 8(4): e62148.
- 42 Chang W, Lin J, Dong J, Li D. Pyroptosis: an inflammatory cell death implicates in atherosclerosis. *Med Hypotheses* 2013; 81(3): 484–486.
- 43 Son SJ, Rhee K, Lim J, Kim TU, Kim T, Kim YS. Triglyceride-induced macrophage cell death is triggered by caspase-1. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(1): 108–113.
- 44 Bai Y, Sun X, Chu Q, Li A, Qin Y, Li Y, Yue E, Wang H, Li G, Zahra SM, Dong C, Jiang Y. Caspase-1 regulate AngII-induced cardiomyocyte hypertrophy via upregulation of IL-1beta. *Biosci Rep* 2018; 38(2): BSR20171438.
- 45 Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011; 145(3): 341–355.
- 46 Huang WQ, Wei P, Lin RQ, Huang F. Protective effects of microrna-22 against endothelial cell injury by targeting NLRP3 through suppression of the inflammasome signaling pathway in a rat model of coronary heart disease. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43(4): 1346–1358.
- 47 Zhu J, Wu S, Hu S, Li H, Li M, Geng X, Wang H. NLRP3 inflammasome expression in peripheral blood monocytes of coronary heart disease patients and its modulation by rosuvastatin. *Mol Med Rep* 2019; 20(2): 1826–1836.
- 48 Satoh M, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126(3): 233–241.
- 49 He J, Yang Y, Peng DQ. Monosodium urate (MSU) crystals increase gout associated coronary heart disease (CHD) risk through the activation of NLRP3 inflammasome. *Int J Cardiol* 2012; 160(1): 72–73.
- 50 Toldo S, Abbate A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15(4): 203–214.
- 51 Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65(14): 1454–1471.
- 52 Li H, Xia Z, Chen Y, Qi D, Zheng H. Mechanism and therapies of oxidative stress-mediated cell death in ischemia reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 2910643.
- 53 Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, Abbate A. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 315(6): H1553–H1568.
- 54 Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(49): 19725–19730.
- 55 Lei Q, Yi T, Chen C. NF-κB-Gasdermin D (GSDMD) axis couples oxidative stress and NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome-mediated cardiomyocyte pyroptosis following myocardial infarction. *Med Sci Monit* 2018; 24: 6044–6052.
- 56 Liu Y, Lian K, Zhang L, Wang R, Yi F, Gao C, Xin C, Zhu D, Li Y, Yan W. TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(5): 415.
- 57 Liu W, Zhang X, Zhao M, Zhang X, Chi J, Liu Y, Lin F. Activation in M1 but not M2 macrophages contributes to cardiac remodeling after myocardial infarction in rats: a critical role of the calcium sensing receptor/NLRP3 inflammasome. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35(6): 2483–2500.
- 58 Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial

- ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2013; 99(1): 164–174.
- 59 Cao R, Fang D, Wang J, Yu Y, Ye H, Kang P, Li Z, Wang H, Gao Q. ALDH2 overexpression alleviates high glucose-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *J Diabetes Res* 2019; 2019: 4857921.
- 60 Luo B, Li B, Wang W, Liu X, Xia Y, Zhang C, Zhang M, Zhang Y, An F. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One* 2014; 9(8): e104771.
- 61 Jeyabal P, Thandavarayan RA, Joladarashi D, Suresh Babu S, Krishnamurthy S, Bhimaraj A, Youker KA, Kishore R, Krishnamurthy P. MicroRNA-9 inhibits hyperglycemia-induced pyroptosis in human ventricular cardiomyocytes by targeting ELAVL1. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 471(4): 423–429.
- 62 Li X, Du N, Zhang Q, Li J, Chen X, Liu X, Hu Y, Qin W, Shen N, Xu C, Fang Z, Wei Y, Wang R, Du Z, Zhang Y, Lu Y. MicroRNA-30d regulates cardiomyocyte pyroptosis by directly targeting foxo3a in diabetic cardiomyopathy. *Cell Death Dis* 2014; 5(10): e1479.
- 63 Li X, Dai Y, Yan S, Shi Y, Han B, Li J, Cha L, Mu J. Down-regulation of lncRNA KCNQ1OT1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 491(4): 1026–1033.
- 64 Coto E, Calvo D, Reguero JR, Morís C, Rubín JM, Díaz-Corte C, Gil-Peña H, Alosno B, Iglesias S, Gómez J. Differential methylation of lncRNA KCNQ1OT1 promoter polymorphism was associated with symptomatic cardiac long QT. *Epigenomics* 2017; 9(8): 1049–1057.
- 65 Yang F, Qin Y, Wang Y, Li A, Lv J, Sun X, Che H, Han T, Meng S, Bai Y, Wang L. LncRNA KCNQ1OT1 mediates pyroptosis in diabetic cardiomyopathy. *Cell Physiol Biochem* 2018; 50(4): 1230–1244.
- 66 Yang F, Qin Y, Lv J, Wang Y, Che H, Chen X, Jiang Y, Li A, Sun X, Yue E, Ren L, Li Y, Bai Y, Wang L. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Cell Death Dis* 2018; 9(10): 1000.
- 67 Zhang X, Fu Y, Li H, Shen L, Chang Q, Pan L, Hong S, Yin X. H3 relaxin inhibits the collagen synthesis via ROS- and P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation in cardiac fibroblasts under high glucose. *J Cell Mol Med* 2018; 22(3): 1816–1825.
- 68 Suetomi T, Willeford A, Brand CS, Cho Y, Ross RS, Miyamoto S, Brown JH. Inflammation and NLRP3 inflammasome activation initiated in response to pressure overload by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta signaling in cardiomyocytes are essential for adverse cardiac remodeling. *Circulation* 2018; 138(22): 2530–2544.
- 69 Li F, Zhang H, Yang L, Yong H, Qin Q, Tan M, Xu L, Liang K, Zong J, Qian W. NLRP3 deficiency accelerates pressure overload-induced cardiac remodeling via increased TLR4 expression. *J Mol Med (Berl)* 2018; 96(11): 1189–1202.
- 70 Colston JT, Boylston WH, Feldman MD, Jenkinson CP, de la Rosa SD, Barton A, Trevino RJ, Freeman GL, Chandrasekar B. Interleukin-18 knockout mice display maladaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(2): 552–558.
- 71 Yoshida T, Friehs I, Mummidi S, del Nido PJ, Addulnour-Nakhoul S, Delafontaine P, Valente AJ, Chandrasekar B. Pressure overload induces IL-18 and IL-18R expression, but markedly suppresses IL-18BP expression in a rabbit model. IL-18 potentiates TNF- α -induced cardiomyocyte death. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 75: 141–151.
- 72 Li R, Lu K, Wang Y, Chen M, Zhang F, Shen H, Yao D, Gong K, Zhang Z. Triptolide attenuates pressure overload-induced myocardial remodeling in mice via the inhibition of NLRP3 inflammasome expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485(1): 69–75.
- 73 Lim S, Lee ME, Jeong J, Lee J, Cho S, Seo M, Park S. sRAGE attenuates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting RAGE-NF κ B-NLRP3 activation. *Inflamm Res* 2018; 67(8): 691–701.
- 74 Yang X, Li X, Yuan M, Tian C, Yang Y, Wang X, Zhang X, Sun Y, He T, Han S, Chen G, Liu N, Gao Y, Hu D, Xing Y, Shang H. Anticancer therapy-induced atrial fibrillation: electrophysiology and related mechanisms. *Front Pharmacol* 2018; 9: 1058.
- 75 Wang Y, Wu Y, Chen J, Zhao S, Li H. Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 inflammasome formation. *Cardiology* 2013; 126(1): 1–11.
- 76 Liu N, Su H, Zhang Y, Liu Z, Kong J. Cholecalciferol cholesterol emulsion attenuates experimental autoimmune myocarditis in mice via inhibition of the pyroptosis signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493(1): 422–428.
- 77 Wang Y, Jia L, Shen J, Wang Y, Fu Z, Su SA, Cai Z, Wang JA, Xiang M. Cathepsin B aggravates coxsackievirus B3-induced myocarditis through activating the inflammasome and promoting pyroptosis. *PLoS Pathog* 2018; 14(1): e1006872.
- 78 Wang Y, Gao B, Xiong S. Involvement of NLRP3 inflammasome in CVB3-induced viral myocarditis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307(10): H1438–H1447.
- 79 Khoury NE, Mathieu S, Fiset C. Interleukin-1 β reduces

- L-type Ca^{2+} current through protein kinase C ϵ activation in mouse heart. *J Biol Chem* 2014; 289(32): 21896–21908.
- 80 Lindner D, Zietsch C, Tank J, Sossalla S, Fluschnik N. Cardiac fibroblasts support cardiac inflammation in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(5): 428.
- 81 Zhang X, Xu A, Lv J, Zhang Q, Ran Y, Wei C, Wu J. Development of small molecule inhibitors targeting NLRP3 inflammasome pathway for inflammatory diseases. *Eur J Med Chem* 2020; 185: 111822.
- 82 Krishnan SM, Ling YH, Huuskes BM, Ferens DM, Saini N, Chan CT, Diep H, Kett MM, Samuel CS, Kemp-Harper BK, Robertson AAB, Cooper MA, Peter K, Latz E, Mansell AS, Sobey CG, Drummond GR, Vinh A. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc Res* 2019; 115(4): 776–787.
- 83 Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J, Wang A, Tao J, Wang C, Liu Q, Jin T, Jiang W, Deng X, Zhou R. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *J Exp Med* 2017; 214(11): 3219–3238.
- 84 Ward R, Li W, Abdul Y, Jackson L, Dong G, Jamil S, Filosa J, Fagan SC, Ergul A. NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia. *Pharmacol Res* 2019; 142: 237–250.
- 85 Pavillard LE, Cañadas-Lozano D, Alcocer-Gómez E, Marín-Aguilar F, Pereira S, Robertson AAB. NLRP3-inflammasome inhibition prevents high fat and high sugar diets-induced heart damage through autophagy induction. *Oncotarget* 2017; 8(59): 99740–99756.
- 86 Qiao J, Wu X, Luo Q, Wei G, Xu M, Wu Y, Liu Y, Li X, Zi J, Ju W, Fu L, Chen C, Wu Q, Zhu S, Qi K, Li D, Li Z, Andrews RK, Zeng L, Gardiner EE, Xu K. NLRP3 regulates platelet integrin α IIb β 3 outside-in signaling, hemostasis and arterial thrombosis. *Haematologica* 2018; 103(9): 1568–1576.
- 87 Fujisue K, Sugamura K, Kurokawa H, Matsubara J, Ishii M, Izumiya Y, Kaikita K, Sugiyama S. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction. *Circ J* 2017; 81(8): 1174–1182.
- 88 Bakhta O, Blanchard S, Guihot A-L, Tamareille S, Mirebeau-Prunier D, Jeannin P, Prunier F. Cardioprotective role of colchicine against inflammatory injury in a rat model of acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2018; 23(5): 446–455.
- 89 Zhang Y, Liu X, Bai X, Lin Y, Li Z, Fu J, Li M, Zhao T, Yang H, Xu R, Li J, Ju J, Cai B, Xu C, Yang B. Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis. *J Pineal Res* 2018; 64(2): 10.1111/jpi.12449.
- 90 Li P, Zhong X, Li J, Liu H, Ma X, He R, Zhao Y. MicroRNA-30c-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated endothelial cell pyroptosis through FOXO3 down-regulation in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503(4): 2833–2840.
- 91 Chen A, Chen Z, Xia Y, Lu D, Yang X, Sun A, Zou Y, Qian J, Ge J. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 499(2): 267–272.
- 92 Zhou Z, Wang Z, Guan Q, Qiu F, Li Y, Liu Z, Zhang H, Dong H, Zhang Z. PEDF inhibits the activation of NLRP3 inflammasome in hypoxia cardiomyocytes through PEDF receptor/phospholipase A2. *Int J Mol Sci* 2016; 17(12): 2064.
- 93 Lv D, Cheng X, Tang L, Jiang M. The cardioprotective effect of total flavonoids on myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Biomed Pharmacother* 2017; 88: 277–284.
- 94 Ding Y, Li J, Guo F, Liu Y, Tong Y, Pan X, Lu X, Ye W, Chen X, Zhang H. Triptolide upregulates myocardial forkhead helix transcription factor p3 expression and attenuates cardiac hypertrophy. *Front Pharmacol* 2016; 7: 471.
- 95 Carmo HD, Arjun S, Petrucci O, Yellon DM, Davidson SM. The caspase 1 inhibitor VX-765 protects the isolated rat heart via the RISK pathway. *Cardiovasc Drugs Ther* 2018; 32(2): 165–168.
- 96 Li Y, Niu X, Xu H, Li Q, Meng L, He M, Zhang J, Zhang Z, Zhang Z. VX-765 attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice by modulating VSMCs pyroptosis. *Exp Cell Res* 2020; 389(1): 111847.
- 97 Rathkey JK, Zhao J, Liu Z, Chen Y, Yang J, Kondolf HC, Benson BL, Chirieleison SM, Huang AY. Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis. *Sci Immunol* 2018; 3(26): eaat2738.
- 98 Pandeya A, Li L, Li Z, Wei Y. Gasdermin D (GSDMD) as a new target for the treatment of infection. *Medchemcomm* 2019; 10(5): 660–667.
- 99 Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med* 2017; 377(12): 1119–1131.