

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2026.02.0140

论著

## NOD样受体 NLRC4 泛素化修饰的分子机制研究

纪芳菲<sup>1</sup>, 赵猛<sup>2</sup>, 牛文彦<sup>3</sup>

(1.天津医科大学医学技术学院,天津 300203;2.天津医科大学肿瘤医院检验科,国家恶性肿瘤临床医学研究中心,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室,天津 300060;3.天津医科大学基础医学院免疫学系,天津 300070)

**摘要** 目的:探究 NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4(NLRC4)是否存在泛素化修饰,并阐明其分子作用机制。方法:选用高转染效率的 HEK293T 细胞进行机制初探,应用免疫共沉淀(Co-IP)和镍-NTA 亲和沉淀(Ni-NTA pull down)检测 NLRC4 的泛素化水平;应用亲和纯化技术联合质谱分析筛选与 NLRC4 相互作用的潜在泛素化调控因子;应用 Co-IP、免疫荧光(IF)和邻位连接技术(PLA)验证蛋白的相互作用;通过过表达泛素化调控因子,应用 Co-IP 实验检测其对 NLRC4 泛素化水平的影响。结果:NLRC4 在 HEK293T 细胞中存在显著的泛素化修饰;质谱鉴定结果显示 E3 泛素连接酶自分泌运动因子受体(AMFR)存在于 NLRC4 纯化的蛋白复合物中;Co-IP、IF 及 PLA 等实验均显示 NLRC4 与 AMFR 存在直接相互作用;过表达 AMFR 可显著增强 NLRC4 的泛素化水平,泛素化 NLRC4 占比明显上调( $t=5.294, P<0.01$ )。结论:NLRC4 在细胞内存在泛素化修饰,且该过程由 E3 泛素连接酶 AMFR 催化。

**关键词** NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4;自分泌运动因子受体;泛素化;E3 泛素连接酶

中图分类号 Q51

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2026)02-0140-06

### The molecular mechanism of ubiquitination in the NOD-like receptor NLRC4

Ji Fangfei<sup>1</sup>, Zhao Meng<sup>2</sup>, Ni Wenyan<sup>3</sup>

(1.School of Medical Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2.Department of Clinical Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China; 3.Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate whether NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) undergoes ubiquitination and elucidate the underlying molecular mechanism. **Methods:** HEK293T cells with high transfection efficiency were used for initial mechanistic exploration. Ubiquitination levels of NLRC4 were assessed using co-immunoprecipitation (Co-IP) and nickel-NTA affinity precipitation (Ni-NTA pull-down). Affinity purification coupled with mass spectrometry was employed to screen for potential ubiquitination regulators interacting with NLRC4. Protein-protein interactions were validated by Co-IP, immunofluorescence (IF), and proximity ligation assay (PLA). By overexpressing ubiquitination regulatory factors, Co-IP was used to assess their impact on NLRC4 ubiquitination levels. **Results:** NLRC4 exhibited significant ubiquitination in HEK293T cells. Mass spectrometry analysis identified the E3 ubiquitin ligase autocrine motility factor receptor (AMFR) within the purified NLRC4 protein complex. Co-IP, IF, and PLA consistently demonstrated a direct interaction between NLRC4 and AMFR. Overexpression of AMFR significantly enhanced NLRC4 ubiquitination levels, with the proportion of ubiquitinated NLRC4 markedly increased ( $t=5.294, P<0.01$ ). **Conclusion:** NLRC4 undergoes ubiquitination in cells, and this process is catalyzed by the E3 ubiquitin ligase AMFR.

**Key words** NLR family CARD domain-containing protein 4; autocrine motility factor receptor; ubiquitination; E3 ubiquitin ligase

NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4(NLRC4)是 NOD 样受体(NLR)家族中的重要成员,是细胞内固有免疫系统中的一个关键模式识别受体,主要参与炎症小体的形成和免疫应答<sup>[1]</sup>。当其识别细菌鞭毛蛋白或Ⅲ型分泌系统蛋白等病原体相关分子模式后,可发生寡聚化并招募凋亡相关斑点样蛋白

(ASC)及半胱天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)前体,进而组装成具有活性的炎症小体复合物,该复合物能够催化 Caspase-1 的自剪切活化,促使白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 和 IL-18 等炎性细胞因子成熟并释放,同时诱导细胞焦亡<sup>[2-3]</sup>。虽然 NLRC4 的激活对于免疫反应和在细菌感染期间驱动炎症至关重要,但其

基金项目 国家自然科学基金面上项目(82270856);天津市科技计划项目(25JCLZJC00350)

作者简介 纪芳菲(2000-),女,硕士在读,研究方向:医学检验技术;通信作者:牛文彦,E-mail:wniu@tmu.edu.cn。

过度激活会导致异常细胞死亡和细胞因子释放,可以引发一系列自身炎症性疾病,如周期性发热、巨噬细胞活化综合征、新生儿小肠结肠炎等<sup>[4]</sup>。因此,深入探究 NLRC4 的精密调控具有重要意义。

蛋白质泛素化是一种动态的、多功能的翻译后修饰,广泛参与调控真核生物的多种生命过程。该修饰由 76 个氨基酸构成的泛素分子所介导,通过 E3 泛素连接酶的特异性识别,与靶蛋白结合进而调节其生物学活性<sup>[5-6]</sup>。通常来说,蛋白质的泛素化大部分介导蛋白质的蛋白酶体途径降解,但多项研究表明泛素化与细胞周期调控、转录、信号转导、自噬、凋亡等多种生命活动相关<sup>[7]</sup>。已知 NLRC4 的活化受到磷酸化<sup>[8]</sup>、乙酰化<sup>[9]</sup>等多种翻译后修饰的精密调控,然而其泛素化修饰的具体调控机制尚不完全清楚,且负责催化该过程的 E3 泛素连接酶尚不明确。自分泌运动因子受体(AMFR)是一种定位于内质网的跨膜蛋白,是含有 RING 结构域的 E3 泛素连接酶,常被报道参与内质网相关降解过程<sup>[10]</sup>。本研究主要探讨 NLRC4 泛素化修饰的分子机制,以确定其 E3 泛素连接酶,揭示 NLRC4 的新型调控机制,为深入理解天然免疫稳态维持及自身炎症性疾病的靶向治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人胚肾细胞系 HEK293T(美国, ATCC), DMEM 培养基(美国, Gibco), 胎牛血清(中国, 蒙马生物科技有限公司), Flag-NLRC4 质粒、His-Ub 质粒、His-AMFR 质粒(中国, 上海吉凯基因科技有限公司), 3×Flag 肽、Anti-Flag M2 亲和凝胶、不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物、PEI 转染试剂(德国, Merck), 非变性组织/细胞裂解液(中国, 上海碧云天生物技术有限公司), Ni-NTA Beads(中国, 常州天地人和生物科技有限公司), BCA 蛋白定量试剂盒、Pierce™ 银染试剂盒(美国, Thermo Fisher), NLRC4 抗体(美国, Santa Cruz Biotechnology), AMFR 抗体、HIS 抗体(中国, Proteintech), Flag 抗体(德国, Sigma-Aldrich), Ub 抗体、耦联 HRP 的山羊抗鼠抗体和山羊抗兔抗体(美国, Cell Signaling Technology), DAPI、封闭山羊血清(中国, 北京索莱宝科技有限公司), 超敏化学发光检测试剂盒(中国, GenStar), NaveniFlex Cell Red 试剂盒(瑞典, Navinci), NP40 buffer(50 mmol/L Tris-HCl, 0.5% NP40, 120 mmol/L NaCl, pH7.5)、Ni-NTA 洗杂液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Imidazole, pH8.0)、Ni-NTA 洗脱液(50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L Imidazole, pH8.0)实验室自配。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** HEK293T 细胞在含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基中培养,将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中,每日观察其生长状态。当细胞密度达到 80%~90%时,使用胰酶进行消化传代。

**1.2.2 质粒转染** HEK293T 细胞密度达 70%~80% 时进行转染,每皿细胞质粒用量为 30 μg,转染体系中质粒与 PEI 转染试剂的比例为 1:3,总体积为 1.5 mL。分别使用无血清 DMEM 培养基配制质粒混合液与转染试剂混合液,各 750 μL,室温条件下静置 5 min 后,轻柔且缓慢地将转染试剂混合液滴加至质粒混合液中,室温静置 20 min,随后补充无血清培养基至 8 mL,将该混合体系加入待转染细胞中,转染 6 h 后,更换为含 10% FBS 的 DMEM 培养基,继续培养 48 h。

**1.2.3 变性及非变性免疫共沉淀实验** HEK293T 细胞质粒转染 48 h 后收集细胞。变性免疫共沉淀实验:每皿加入 1 mL 变性蛋白裂解液(含 4% SDS、NP40 buffer 及蛋白酶抑制剂),用细胞刮刀刮下细胞,95℃加热 20 min,取 100 μL 作为 Input,剩余蛋白裂解物用 NP40 buffer 稀释 10 倍。非变性免疫共沉淀实验:每皿加入 1 mL 含蛋白酶抑制剂的非变性组织/细胞裂解液,刮取细胞后置于垂直混合仪上,4℃旋转裂解 1 h,4℃ 12 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液于样本管中,取 100 μL 作为 Input。取适量包被抗 Flag 抗体的琼脂糖珠子,用相应裂解缓冲液洗涤 3 次后均分至各样本管中,4℃旋转结合过夜。次日,用相应裂解缓冲液洗涤珠子 6 次,最后 1 次吸弃上清,加入适量 3×Flag 肽洗脱蛋白,4℃旋转置换 4 h,随后离心收集上清液,加入 5×loading buffer(与蛋白样本体积比为 1:4),95℃变性 10 min,置于-20℃保存或用于后续实验。

**1.2.4 镍-NTA 亲和沉淀实验** HEK293T 细胞质粒转染 48 h 后收集细胞。每皿加入 1 mL 变性蛋白裂解液,具体操作方法同变性免疫共沉淀实验。从 4℃取适量 Ni-NTA 琼脂糖珠子,用 1 mL 纯水洗涤 1 次,再用 1 mL NP40 buffer 洗涤 3 次,洗完后将珠子均分至各样本管中,4℃旋转结合过夜。次日,用 1 mL NP40 buffer 洗涤 3 次,再用 1 mL Ni-NTA 洗杂液洗 3 次,后 1 次吸弃上清,加入适量 Ni-NTA 洗脱液,4℃旋转置换 4 h,随后离心收集上清液,加入 5×loading buffer,95℃变性 10 min,置于-20℃保存或用于后续实验。

**1.2.5 免疫印迹** 配制 7.5%的聚丙烯酰胺凝胶,蛋白上样后进行电泳,随后 260 mA 恒流转膜 1.5 h,1×

TBST 配制 5% 的牛奶并封闭 2 h, 封闭完成后加入一抗置于 4℃ 摇床孵育过夜, 一抗包括 Flag(1:1 000)、Ub(1:1 000)、His(1:1 000)、AMFR(1:1 000)。次日, 1×TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 配制耦联 HRP 的二抗(1:5 000)室温孵育 2 h, 再用 1×TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 最后加入显影液进行曝光。

1.2.6 银染 纯化后的蛋白样本进行 SDS-PAGE 分离, 将胶块转移至 10 cm 皿中, 按照银染试剂盒说明书进行后续实验操作。最后将染好的胶块拍照留存, 用干净的手术刀切下差异条带送测进行质谱分析。

1.2.7 细胞免疫荧光 HEK293T 细胞转染 Flag-NLRC4 和 His-AMFR 质粒, 48 h 后收集细胞, 用 PBS 清洗细胞后加入冰无水甲醇固定及通透细胞 20 min, PBS 清洗细胞 3 次, 配制 5% 的山羊血清并于 37℃ 培养箱中封闭 1 h, 加入一抗 NLRC4(1:50) 和 AMFR(1:50) 孵育过夜。次日, PBS 清洗细胞 3 次, 加入荧光二抗 (TR 红光 1:500, 488 绿光 1:200) 置于摇床上室温避光孵育 1 h, PBS 清洗细胞 3 次, DAPI 染液稀释 10 倍后滴加到爬片上, 室温避光孵育 10 min, PBS 清洗细胞 3 次, 爬片取出晾干后

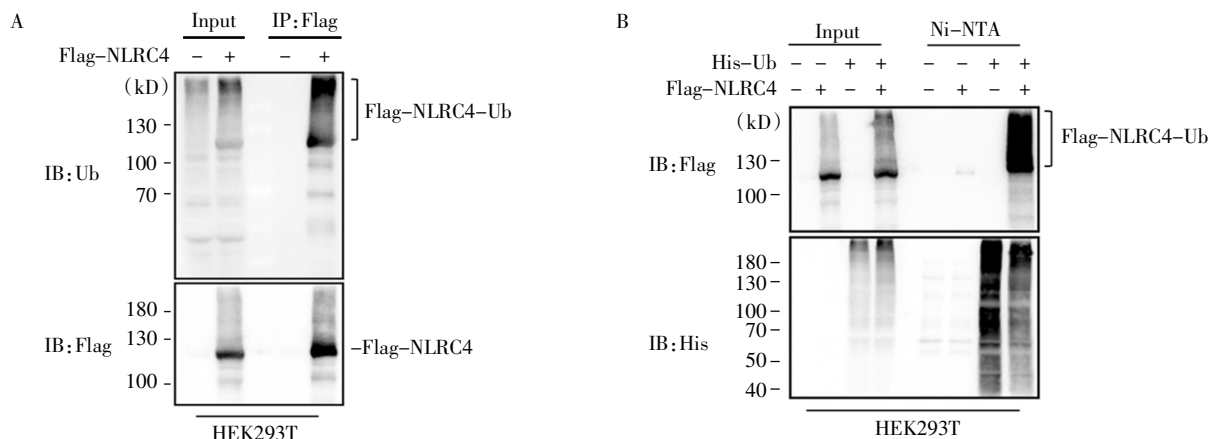
滴加一滴防荧光淬灭封片剂, 用透明指甲油封片, 晾干后于荧光显微镜下采集图像或置于 4℃ 保存。

1.2.8 邻位连接技术 HEK293T 细胞转染 Flag-NLRC4 和 His-AMFR 质粒, 48 h 后收集细胞, 用 PBS 清洗细胞后加入冰无水甲醇固定及通透细胞 20 min, PBS 慢速清洗细胞 3 次, 按照 NaveniFlex Cell Red 试剂盒说明书进行后续实验操作。封片晾干后于共聚焦显微镜下采集图像或置于 4℃ 保存。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism8 统计软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NOD 样受体 NLRC4 存在泛素化修饰 变性免疫共沉淀实验结果显示, 利用包被有抗 Flag 抗体的琼脂糖珠子对标签蛋白的富集作用, 在 Flag-NLRC4 蛋白复合物中可检测到明显的泛素化修饰条带(图 1A)。镍-NTA 亲和沉淀实验结果显示, 在 His-Ub 富集的泛素化蛋白复合物中同样可检测到 Flag-NLRC4 蛋白的存在(图 1B)。



注: Input: 全细胞裂解液; NLRC4: NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4; Flag-NLRC4: Flag 标签标记的 NLRC4 质粒; Ub: 泛素; His-Ub: His 标签标记的 Ub 质粒; A: 免疫印迹检测 Flag-NLRC4 的泛素化水平; B: 免疫印迹检测 His-Ub 与 Flag-NLRC4 的相互作用关系

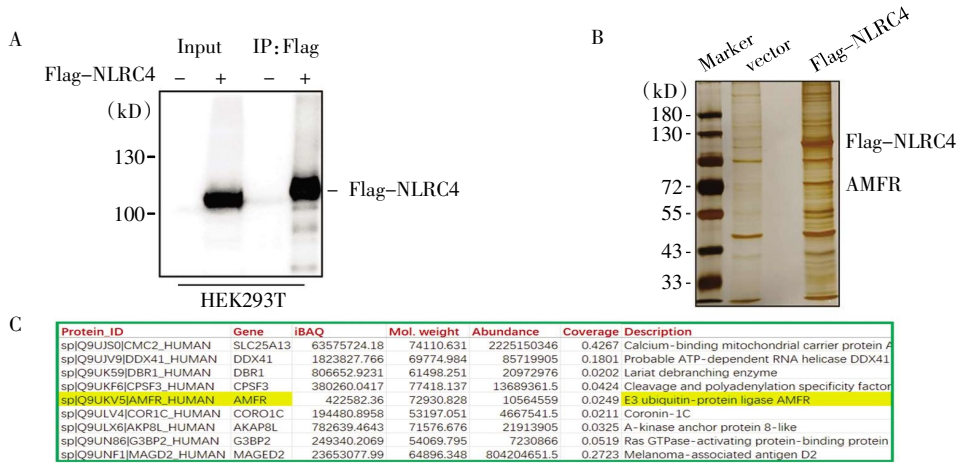
图 1 NOD 样受体 NLRC4 存在泛素化修饰

Fig.1 The NOD-like receptor NLRC4 undergoes ubiquitination

2.2 亲和纯化联合质谱分析筛选 NLRC4 相互作用蛋白 利用抗 Flag 琼脂糖珠对过表达 Flag-NLRC4 的 HEK293T 细胞裂解液进行亲和纯化, 通过 SDS-PAGE 分离纯化产物并进行银染分析。免疫印迹结果显示, Flag-NLRC4 被成功纯化(图 2A)。选取银染图谱中有差异的蛋白条带进行胶内酶解与质谱鉴定(图 2B)。质谱分析结果显示, 与空载对照组相比, E3 泛素连接酶 AMFR 在 Flag-NLRC4 实验组中富集(图 2C)。

2.3 E3 泛素连接酶 AMFR 与 NLRC4 存在相互作用 非变性免疫共沉淀结果显示, AMFR 可特异性

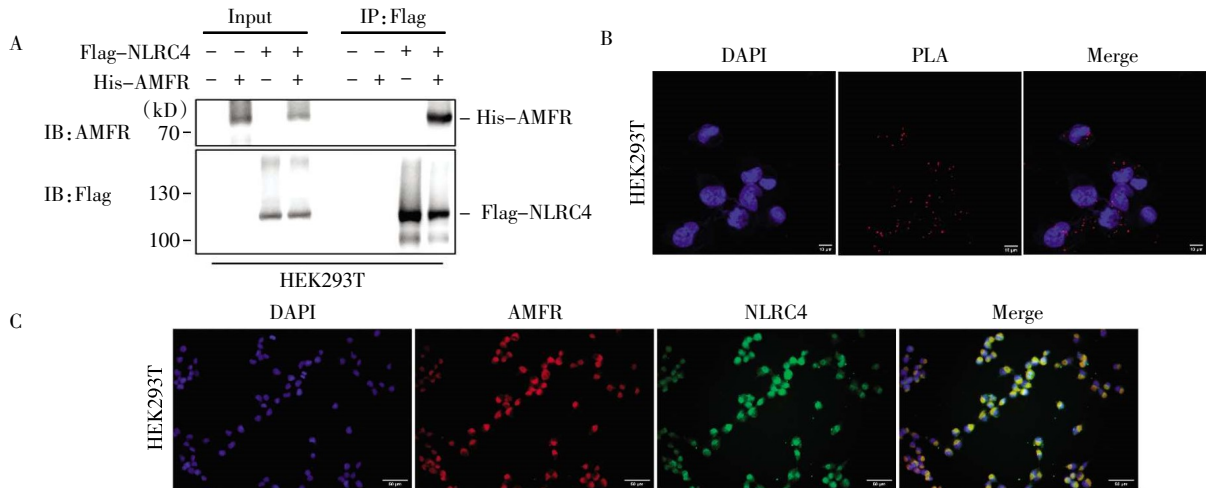
富集于 Flag-NLRC4 的蛋白复合物中, 表明两者存在相互作用(图 3A)。在 HEK293T 细胞中转染 Flag-NLRC4 和 His-AMFR 质粒, 利用邻位连接技术对两蛋白的相互作用和空间接近程度进行检测, 每个红色点状簇代表了 AMFR 与 NLRC4 足够接近, 致使两探针在聚合酶链反应扩增以及聚合后能够发出红色的荧光信号, 结果显示两者存在相互作用(图 3B)。同样, 利用免疫荧光检测 AMFR 与 NLRC4 的蛋白定位和分布情况, 结果显示, 两者均主要定位于细胞质, 并在空间上重叠, 存在显著的共定位(图 3C)。



注: Input: 全细胞裂解液; Flag-NLRC4: Flag 标签标记的 NLRC4 质粒; vector: 空载对照组; AMFR: 自分泌运动因子受体; NLRC4: NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4; A: 免疫印迹验证 Flag-NLRC4 蛋白纯化效果; B: 蛋白纯化产物银染分析; C: 银染图谱中差异蛋白条带质谱鉴定分析结果

图 2 亲和纯化联合质谱分析筛选 NLRC4 相互作用蛋白

Fig.2 Screening of NLRC4-interacting proteins by affinity purification coupled with mass spectrometry



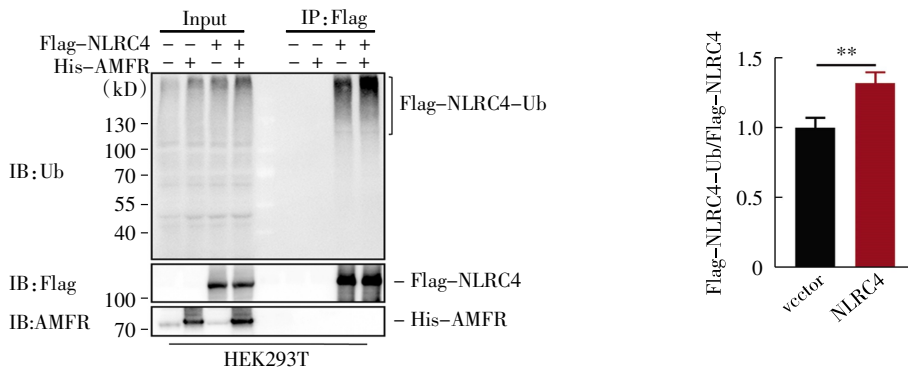
注: Input: 全细胞裂解液; Flag-NLRC4: Flag 标签标记的 NLRC4 质粒; His-AMFR: His 标签标记的 AMFR 质粒; PLA: 邻位连接技术; NLRC4: NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4; AMFR: 自分泌运动因子受体; A: 免疫印迹检测 His-AMFR 与 Flag-NLRC4 的相互作用关系; B: PLA 检测 His-AMFR 与 Flag-NLRC4 的相互作用和空间接近程度(放大倍数 630×, 比例尺=10 μm); C: 免疫荧光检测 His-AMFR 与 Flag-NLRC4 的蛋白定位和分布(放大倍数 200×, 比例尺=50 μm)

图 3 E3 泛素连接酶 AMFR 与 NLRC4 存在相互作用

Fig.3 The E3 ubiquitin ligase AMFR interacts with NLRC4

2.4 过表达 AMFR 促进 NLRC4 的多聚泛素化修饰  
免疫共沉淀结果显示, 过表达 AMFR 可显著增加

NLRC4 的泛素化水平, 泛素化 NLRC4 在总 NLRC4 中占比显著上调( $t=5.294, P<0.01$ ), 见图 4。



注: Ub: 泛素; AMFR: 自分泌运动因子受体; NLRC4: NLR 家族含 CARD 结构蛋白 4; vector: 空载对照组; Input: 全细胞裂解液; Flag-NLRC4: Flag 标签标记的 NLRC4 质粒; His-AMFR: His 标签标记的 AMFR 质粒; \*\* $P<0.01$

图 4 过表达 AMFR 促进 NLRC4 的多聚泛素化修饰

Fig.4 Overexpression of AMFR promotes polyubiquitination of NLRC4

### 3 讨论

NLRC4 炎症小体作为天然免疫系统的关键组分,其精密调控对于维持机体免疫稳态至关重要。本研究通过系统性实验揭示了 NLRC4 泛素化修饰的分子机制,明确 E3 泛素连接酶 AMFR 是 NLRC4 的关键泛素化调控因子,能够与 NLRC4 相互作用并催化其泛素化修饰,为深入理解 NLRC4 的调控机制提供了新的视角。

蛋白质的功能调控受动态翻译后修饰网络的精细调节。其中,泛素化作为一种关键调控机制,通过 E1-E2-E3 三级酶联反应将 76 个氨基酸组成的泛素分子共价连接至底物蛋白。E1 泛素激活酶在 ATP 供能下启动泛素化过程,将泛素单体转移至 E2 泛素结合酶上,在 E3 泛素连接酶的特异性识别下,泛素最终从 E2 转移至底物蛋白<sup>[11-12]</sup>。这一修饰可导致底物蛋白的重要特性发生变化,包括它们的活性、细胞定位、半衰期、与其他蛋白的相互作用等<sup>[13]</sup>。泛素化修饰广泛参与细胞生命活动的调控,其功能失调与癌症、神经退行性变、免疫紊乱等多种疾病密切相关<sup>[14-15]</sup>。近年来,多项研究表明泛素化修饰在炎症小体调控中发挥关键作用。对 NLRP3 炎症小体的研究显示,E3 泛素连接酶 TRIM31<sup>[16]</sup>和 MARCH7<sup>[17]</sup>通过 K48 连接的泛素化促进 NLRP3 的蛋白酶体降解,抑制炎症小体激活,而去泛素化酶 BRCC3 通过移除 NLRP3 的泛素化修饰正调控其活化<sup>[18-19]</sup>。相比之下,NLRC4 的泛素化调控机制尚不明确,其是否发生泛素化修饰以及该修饰是否参与调控其生物学功能,目前均有待进一步研究。本研究围绕 NLRC4 的泛素化修饰机制展开探索,证实 NLRC4 在细胞中发生泛素化修饰,并通过亲和纯化联合质谱分析筛选出与之相互作用的潜在泛素化调控因子。

E3 泛素连接酶 AMFR(又称 Gp78)是一种具有多重生物学功能的膜结合糖蛋白。作为内质网驻留蛋白,AMFR 不仅参与内质网相关蛋白降解(ERAD)过程,负责识别并清除功能障碍蛋白,还可作为细胞膜表面受体与自分泌运动因子(AMF)结合,通过多重信号通路调控细胞生理功能<sup>[20-21]</sup>。研究表明,AMFR 通过催化序列相似性家族 134B(FAM134B)泛素化,促进内质网(ER)噬菌并控制 ER 重塑以响应细胞需求<sup>[22]</sup>。在阿尔茨海默病中,AMFR 通过促进泛素化修饰介导淀粉样前体蛋白(APP)的降解来减少  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )的产生并减轻认知障碍<sup>[23]</sup>。然而,AMFR 是否参与 NLRC4 的调控,目前尚未见报道。本研究通过多种实验方法证实 AMFR 与 NLRC4 存在直接相互作用,且过表达 AMFR 可显著增加

NLRC4 的泛素化水平。提示 NLRC4 是 AMFR 的新型底物蛋白,AMFR 很有可能通过泛素化修饰调控 NLRC4 的分子功能。特别值得探讨的是 AMFR 介导的泛素化修饰在 NLRC4 双重功能中的潜在作用。最新研究表明,NLRC4 能够通过独立于经典炎症小体的机制,在 DNA 损伤修复中发挥肿瘤抑制作用<sup>[24]</sup>。此外,在人结直肠癌细胞中恢复 NLRC4 的表达可以触发由 I 型干扰素信号基因组成的炎症小体非依赖性免疫重编程,增强抗肿瘤免疫应答<sup>[25]</sup>。笔者推测 AMFR 可能通过不同形式的泛素化修饰,分别调控 NLRC4 在炎症小体活化和肿瘤抑制中的作用。在病理生理学层面,AMFR-NLRC4 调控轴的异常可能同时参与自身炎症性疾病和肿瘤的发生、发展,为理解相关疾病的分子机制提供了新的思路。

综上所述,本研究证实了 NLRC4 在细胞中存在泛素化修饰,并将 AMFR 鉴定为其特异性 E3 泛素连接酶,不仅拓展了对 NLRC4 炎症小体翻译后调控网络的认知,也为解析其在免疫调控和肿瘤抑制中的双重作用提供了新视角。本研究的局限性在于尚未明确 AMFR 介导 NLRC4 泛素化的具体位点及泛素化连接类型,且主要在高转染效率的 HEK293T 细胞中进行机制初探。未来研究需在更接近生理条件的模型系统中进一步验证该调控轴的功能,并深入探讨其在不同病理条件下的具体作用机制,为相关疾病的防治提供更全面的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] WEN J, XUAN B, LIU Y, et al. Updating the NLRC4 inflammasome: from bacterial infections to autoimmunity and cancer[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 702527.
- [2] DUBEY S R, TURNBULL C, PANDEY A, et al. Molecular mechanisms and regulation of inflammasome activation and signaling: sensing of pathogens and damage molecular patterns[J]. *Cell Mol Immunol*, 2025, 22(11): 1313-1344.
- [3] KAY C, WANG R, KIRKBY M, et al. Molecular mechanisms activating the NAIP-NLRC4 inflammasome: implications in infectious disease, autoinflammation, and cancer[J]. *Immunol Rev*, 2020, 297(1): 67-82.
- [4] WILLEMSSEN M, ROOSENS W, STAELS F, et al. NLRC4-associated autoinflammatory disease: insights from mouse models and somatic variants[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2025, 155(3): 803-807.
- [5] SONG L, LUO Z Q. Post-translational regulation of ubiquitin signaling[J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(6): 1776-1786.
- [6] TOMA-FUKAI S, SHIMIZU T. Structural diversity of ubiquitin E3 ligase[J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6682.
- [7] BHATS A, VASI Z, ADHIKARI R, et al. Ubiquitin proteasome system in immune regulation and therapeutics[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2022, 67: 102310.
- [8] LIU W, LIU X, LI Y, et al. LRRK2 promotes the activation of NLRC4 inflammasome during salmonella typhimurium infection[J]. *J*

- Exp Med, 2017, 214(10): 3051–3066.
- [9] GUAN C, HUANG X, YUE J, et al. SIRT3-mediated deacetylation of NLRC4 promotes inflammasome activation [J]. *Theranostics*, 2021, 11(8): 3981–3995.
- [10] WANG Z, NIU K, LIU W, et al. ER-phagy activation by AMFR attenuates cardiac fibrosis post-myocardial infarction via mTORC1 pathway[J]. *Adv Sci*, 2025, 12(37): e04552.
- [11] GAVALI S, LIU J, LI X, et al. Ubiquitination in T-cell activation and checkpoint inhibition: new avenues for targeted cancer immunotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10800.
- [12] SU S, TIAN R, JIAO Y, et al. Ubiquitination and deubiquitination: implications for the pathogenesis and treatment of osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*, 2024, 49: 156–166.
- [13] ZHENG N, SHABEK N. Ubiquitin ligases: structure, function, and regulation[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 129–157.
- [14] DANG F, NIE L, WEI W. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(2): 427–438.
- [15] TOKUNAGA F, IKEDA F. Linear ubiquitination in immune and neurodegenerative diseases, and beyond[J]. *Biochem Soc Trans*, 2022, 50(2): 799–811.
- [16] LEE Y, YOON B, SON S, et al. Inhibition of immunoproteasome attenuates NLRP3 inflammasome response by regulating E3 ubiquitin ligase TRIM31[J]. *Cells*, 2024, 13(8): 675.
- [17] ZHAO Y, MIAO C, WANG R, et al. Jianpi antai formula prevents miscarriage by repressing M1 polarization of decidual macrophages through ubiquitination of NLRP3 mediated by MARCH7[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117796.
- [18] BEESEETTI S. Ubiquitin ligases in control: regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2025, 30(3): 25970.
- [19] YALCINKAYA M, LIU W, THOMAS L A, et al. BRCC3-mediated NLRP3 deubiquitylation promotes inflammasome activation and atherosclerosis in Tet2 clonal hematopoiesis[J]. *Circulation*, 2023, 148(22): 1764–1777.
- [20] JOSHI V, UPADHYAY A, KUMAR A, et al. Gp78 E3 ubiquitin ligase: essential functions and contributions in proteostasis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 259.
- [21] ZHANG H, WEI R, YANG X, et al. AMFR drives allergic asthma development by promoting alveolar macrophage-derived GM-CSF production[J]. *J Exp Med*, 2022, 219(5): e20211828.
- [22] GONZÁLEZ A, COVARRUBIAS-PINTO A, BHASKARA R M, et al. Ubiquitination regulates ER-phagy and remodelling of endoplasmic reticulum[J]. *Nature*, 2023, 618(7964): 394–401.
- [23] ZHANG J, LIU C, LIU J, et al. The autocrine motility factor receptor delays the pathological progression of Alzheimer's disease via regulating the ubiquitination-mediated degradation of APP [J]. *Alzheimer's Res Ther*, 2025, 17: 95.
- [24] SHEN C, PANDEY A, ENOSI TUIPULOTU D, et al. Inflammasome protein scaffolds the DNA damage complex during tumor development[J]. *Nat Immunol*, 2024, 25(11): 2085–2096.
- [25] DOMBLIDES C, CRAMPTON S, LIU H, et al. Human NLRC4 expression promotes cancer survival and associates with type I interferon signaling and immune infiltration[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(11): e166085.

(2025-10-27 收稿)

(上接第 139 页)

- [24] BALKWILL F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(2): 135–141.
- [25] DING M, WANG C, HU J, et al. PLOD3 facilitated T cell activation in the colorectal tumor microenvironment and liver metastasis by the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 30.
- [26] LIU B X, XIE Y, ZHANG J, et al. SERPINB5 promotes colorectal cancer invasion and migration by promoting EMT and angiogenesis via the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 131: 111759.
- [27] COUSSENS L M, WERB Z. Inflammation and cancer[J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860–867.
- [28] WANG L, CHEN W, JIN H, et al. CXCL1/IGHG1 signaling enhances crosstalk between tumor cells and tumor-associated macrophages to promote MC-LR-induced colorectal cancer progression [J]. *Environ Pollut*, 2024, 351: 124081.

(2025-06-30 收稿)