

NLRP3 炎性小体在急性胰腺炎中的表达及临床意义

夏炳杰, 强占荣, 李桂鲜, 秦振梅, 骆雪萍

(桂林医学院第二附属医院 重症医学科, 桂林 541199)

摘要: 为探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎性小体在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)中的表达及临床意义, 以 160 例 AP 患者为研究对象, 按 AP 病情严重程度分为轻症 AP(mild AP, MAP)组(52 例)、中度重症 AP(moderately severe AP, MSAP)组(50 例)和重症 AP(severe AP, SAP)组(58 例); 根据患者临床结局, 分为存活组(135 例)和死亡组(25 例)。采用 RT-PCR、Western blotting 检测各组 PBMC 中 *NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 及相关蛋白表达, ELISA 检测相关细胞因子(IL-1 β 、IL-18)水平, 分别比较各组指标的差异, 评价 NLRP3 水平对 AP 患者病情严重程度的预测价值。结果显示, 不同严重程度 AP 组间外周血 *NLRP3* mRNA 及蛋白表达, *Caspase-1* mRNA 及 Cleaved-Caspase-10、Cleaved-Caspase-20 蛋白表达, 外周血 IL-1 β 、IL-18 水平比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中 SAP 组上述指标水平最高, MSAP 组次之, MAP 组最低。死亡组患者 *NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达水平及外周血 IL-1 β 、IL-18 水平明显高于存活组($P < 0.05$)。AP 患者 PBMC *NLRP3* mRNA 表达与 *Caspase-1* mRNA、外周血 IL-1 β 和 IL-18 水平呈正相关($r=0.742$, $P=0.000$; $r=0.610$, $P=0.015$; $r=0.570$, $P=0.019$), 与 AP 病情严重程度评分[修正 CT 严重指数(modified CT severity index, MCTSI)评分、Ranson 评分及急性生理与慢性健康评估(acute physiology and chronic health evaluation, APACHE II)评分]呈正相关($r=0.705$, $P=0.004$; $r=0.690$, $P=0.006$; $r=0.638$, $P=0.012$)。受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析显示, *NLRP3* mRNA 的 AUC 为 0.851[95% 可信区间(confidence interval, CI) 0.778~0.923], 其最佳工作点为 2.25, 此时预测 AP 患者病情严重程度的敏感性和特异性分别为 76.00% 和 85.71%, 均显著优于 IL-1 β 和 IL-18。NLRP3 参与了 AP 患者的机体炎症反应, 在对 AP 患者病情严重程度的预测方面具有一定的应用价值。

关键词: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; 白细胞介素 1 β ; 白细胞介素 18; 急性胰腺炎

中图分类号: R392.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)06-0460-05

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是由大量炎性介质介导的炎症反应综合征, 是临床常见的急腹症之一, 对于部分重症 AP(severe AP, SAP)患者, 其病死率高达 50%^[1]。因此, 明确 AP 发病机制, 针对 AP 病情准确评估与治疗, 是提高该病治疗效果的关键。近年来, 已有研究表明, AP 的发生及进展与炎症反应的激活密切相关^[2]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎性小体是免疫炎症反应的重要组成部分, 参与了众

多炎症性疾病如器官缺血再灌注损伤、慢性阻塞性肺疾病及动脉粥样硬化等的发生、发展过程^[3-5]。然而, 在 AP 患者体内 NLRP3 炎性小体与疾病发生、病情严重程度及预后的相关性如何, 目前尚未阐明。本研究通过检测 AP 患者 NLRP3 炎性小体及下游炎性因子水平, 揭示 NLRP3 炎性小体在 AP 发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 1 月至 2018 年 10 月于桂林医学院第二附属医院就诊住院的 AP 患者(160 例)作为研究对象, 其中男性 85 例、女性 75 例, 中位年龄 55.8(33~79)岁。致病原因: 胆囊及胆管结石(68 例)、暴饮暴食及酒精性因素(32 例)、高脂血症(20 例)、药物性因素(15 例)、自身免疫性因素(10 例)、内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)后(5 例)及其他因素(10 例)。所有患者均

收稿日期: 2019-01-17

基金项目: 2017 年度广西高校中青年教师基础能力提升项目(2017KY0480); 2016 年度广西卫计委医药卫生自筹经费计划课题(Z2016040)

作者简介: 夏炳杰(1981—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事重症胰腺炎的临床诊治研究

通信作者: 骆雪萍(E-mail: lmfcq01@163.com)

符合《急性胰腺炎诊治指南(2014)》^[6]。排除标准:合并恶性肿瘤、全身严重感染、严重肝肾功能不全、其他自身免疫性疾病和免疫缺陷的患者。根据 AP 分类标准,按 AP 病情严重程度分为轻症 AP(mild AP, MAP)组(52 例)、中度重症 AP(moderately severe AP, MSAP)组(50 例)和 SAP 组(58 例);根据患者临床结局,分为存活组(135 例)和死亡组(25 例)。各组间在性别、年龄、致病原因等方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。该研究获得了桂林医学院第二附属医院伦理委员会的批准,并征得了患者家属的知情同意。

1.2 主要设备及试剂 主要设备:荧光定量 PCR 仪(Bio-rad 公司)。主要试剂:人淋巴细胞分离液(Sigma 公司);RT 试剂盒、实时荧光定量试剂盒(TaKaRa 公司);Western blotting 相关试剂盒如二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天公司);人血清 IL-1 β 和 IL-18 ELISA 试剂盒(中国博士德公司);抗 NLRP3、Cleaved-Caspase-10 和 Cleaved-Caspase-20 单克隆抗体(Abcam 公司);抗甘油醛-2-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(Santa 公司)。

1.3 方法

1.3.1 一般临床资料采集 记录患者一般临床资料如年龄、性别、基础疾病等,同时记录患者入院 12 h 的修正 CT 严重指数(modified CT severity index, MCTSI)评分、Ranson 评分及急性生理与慢性健康评估(acute physiology and chronic health evaluation, APACHE II)评分。

1.3.2 分离 PBMC 取各组患者静脉血 5 mL,置于 EDTA 抗凝管,按照 1:1 比例与人外周血淋巴细胞分离液混匀后离心,分离 PBMC,将 1 mL TRIzol 加入 PBMC 中混匀后备用。

1.3.3 RT-PCR 检测 NLRP3、Caspase-1 mRNA 水平 运用 TRIzol 法提取各组 PBMC 总 RNA,测定 RNA 浓度,然后按 RT 试剂盒说明书进行操作。其中 PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(表 1)。依据 TaKaRa 公司提供的荧光定量 PCR 试剂盒说明书建立 20 μ L 反应体系,反应条件:预变性,95 $^{\circ}$ C 120 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;溶解曲线:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 15 s。结果分析:以 GAPDH 为内参,计算各组相应基因的 $\Delta\Delta C_t$ 值。以目的基因的量为定量结果进行统计学分析。

表 1 RT-PCR 的引物序列

基因名称	正向引物	反向引物
NLRP3	CATGAGTGCTGCTTCGACAT	GCTTCAGTCCCACACAGA
Caspase-1	ATCGCTTTCTGCTCTTCCAC	TCCTCCACATCACAGGAACA
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT

1.3.4 Western blotting 检测 PBMC NLRP3、Caspase-1 蛋白的表达 提取各组人 PBMC 总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白于 10%PAGE 分离后,转移至硝基纤维素膜,给予 5%脱脂牛奶封闭 2 h,分别孵育抗 NLRP3 抗体(1:400)、抗 Cleaved-Caspase-10 抗体(1:300)、抗 Cleaved-Caspase-20 抗体(1:300)及抗 GAPDH 抗体(1:400),4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜。次日取出膜,给予避光室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000),用凝胶成像系统测定蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的条带与 GAPDH 灰度比值。

1.3.5 外周血细胞因子(IL-1 β 、IL-18)的检测 取各组患者清晨空腹静脉血 4 mL,离心后收集上清,采用 ELISA 测定不同组间外周血 IL-1 β 和 IL-

18 水平,具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。采用 Spearman 相关法分析 NLRP3 mRNA 表达量与相关细胞因子及病情严重程度评分的相关性。运用 Graphpad 软件做受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析,计算 NLRP3 mRNA 的 AUC、最佳工作点、敏感性、特异性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同严重程度 AP 组间 NLRP3、Caspase-1 mRNA 和相关蛋白表达水平及外周血 IL-1 β 、IL-18 水平的比较 不同严重程度组间 PBMC NLRP3

mRNA 及蛋白表达, *Caspase-1* mRNA 及 Cleaved-Caspase-10、Cleaved-Caspase-20 蛋白水平比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中, SAP 组 PBMC *NLRP3* mRNA 和蛋白表达水平, *Caspase-1* mRNA 及 Cleaved-Caspase-10、Cleaved-Caspase-20 蛋白水平, 外周血 IL-1 β 、IL-18 水平明显高于 MSAP 组和 MAP 组, MSAP 组上述指标明显高于 MAP 组 ($P < 0.05$)。(图 1、图 2 和表 2)

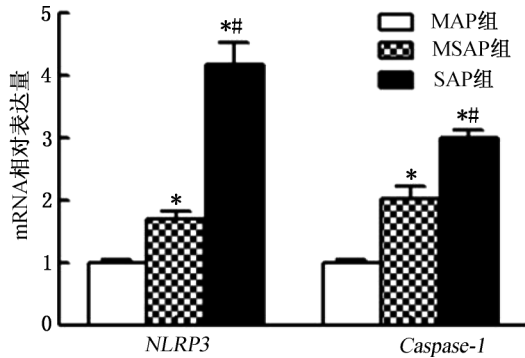


图 1 不同严重程度 AP 组患者 PBMC *NLRP3* 及 *Caspase-1* mRNA 水平的比较

注: 与 MAP 组比较, * $P < 0.05$; 与 MSAP 组比较, # $P < 0.05$

表 2 不同严重程度 AP 组患者外周血 IL-1 β 和 IL-18 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-1	IL-18
MAP 组	52	24.31 \pm 3.12	29.09 \pm 4.06
MSAP 组	50	31.28 \pm 3.09 *	38.27 \pm 3.52 *
SAP 组	58	72.42 \pm 5.38 * #	80.30 \pm 6.05 * #

注: 与 MAP 组比较, * $P < 0.05$; 与 MSAP 组比较, # $P < 0.05$

表 3 不同预后组 *NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达水平及外周血 IL-1 β 、IL-18 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	<i>NLRP3</i> mRNA	<i>Caspase-1</i> mRNA	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)
存活组	135	1.01 \pm 0.09	1.05 \pm 0.10	32.83 \pm 8.12	42.37 \pm 10.27
死亡组	25	3.46 \pm 0.47 *	2.76 \pm 0.28 *	60.14 \pm 11.72 *	72.16 \pm 13.28 *

注: 与存活组比较, * $P < 0.05$

2.3 AP 患者 *NLRP3* 与各指标的相关性分析 AP 患者 PBMC *NLRP3* mRNA 与 *Caspase-1* mRNA 及外周血 IL-1 β 、IL-18 水平呈正相关 ($r=0.742$, $P=0.000$; $r=0.610$, $P=0.015$; $r=0.570$, $P=0.019$); 与 AP 病情严重程度评分 (MCTSI 评分、Ranson 评分及 APACHE II 评分) 呈正相关 ($r=0.705$, $P=0.004$; $r=0.690$, $P=0.006$; $r=0.638$, $P=0.012$)。

2.4 *NLRP3* 水平对 AP 患者病情严重程度预测的

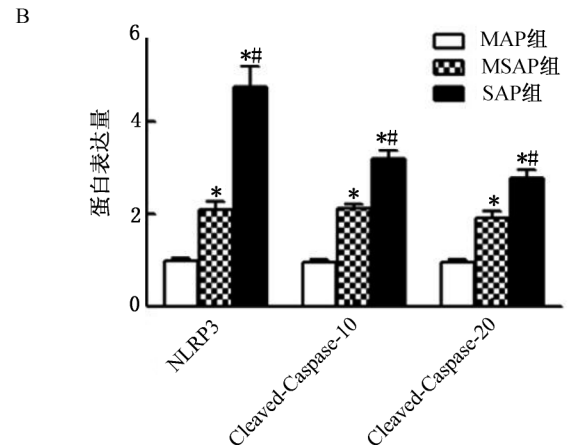
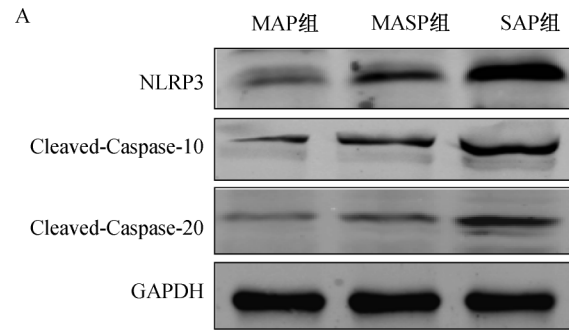


图 2 各组 AP 患者 PBMC *NLRP3*、Cleaved-Caspase-10 和 Cleaved-Caspase-20 蛋白表达水平的比较

注: 与 MAP 组比较, * $P < 0.05$; 与 MSAP 组比较, # $P < 0.05$

2.2 不同预后组 *NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达水平及外周血 IL-1 β 、IL-18 水平的比较 死亡组患者 *NLRP3*、*Caspase-1* mRNA 表达水平和外周血 IL-1 β 、IL-18 水平明显高于存活组 ($P < 0.05$)。(表 3)

ROC 曲线分析 以 *NLRP3* mRNA 水平评估 AP 患者病情严重程度, 绘制 ROC 曲线。结果显示, *NLRP3* mRNA 水平的 AUC 为 0.851[95% 可信区间(confidence interval, CI) 0.778~0.923], 其最佳工作点为 2.25, 按此最佳工作点对 AP 患者病情严重程度进行预测, 其敏感性和特异性分别为 76.00% 和 85.71%, 均明显优于 IL-1 β 和 IL-18。(图 3)

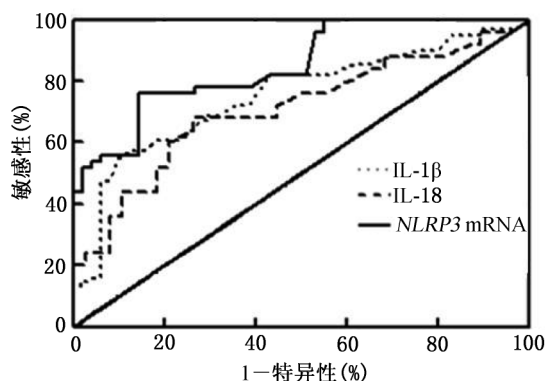


图3 各指标的ROC曲线分析

3 讨论

AP的病因是由多种致病原因引起的激酶激活,导致机体炎性因子过度释放,胰腺局部形成炎症反应,病情严重者可伴随全身炎症反应及多器官功能障碍。目前,对于AP病情严重程度的评估,临床常采用Ranson及APACHE II评分法,但这些方法往往存在一定的滞后性,无法提前进行评估^[7]。传统的炎性指标如CRP、IL-6等,对于AP病情严重程度的评估有一定的参考价值,但特异性偏低^[8]。因此,探寻特异性指标,准确预测AP患者病情的严重程度,对于提高AP患者治疗效果及预后具有重要的临床意义。

近年来,随着固有免疫研究的进展,由免疫炎性小体介导的炎症反应在多种疾病如器官缺血再灌注损伤、脓毒症、恶性肿瘤等的发生、发展中的作用备受关注^[9-11]。NLRP3是由胞浆内多种蛋白质组成的复合体,其含有凋亡相关微粒蛋白、Caspase-1等,是天然免疫系统的重要组成部分。通常情况下,机体NLRP3活性处于抑制状态,当NLRP3受外在刺激被激活时,活化的Caspase-1随后激活IL-1 β 和IL-18,产生炎症级联反应^[12]。目前,已知存在5种炎性小体,其中NLRP3炎性小体研究较多,其结构和功能最明确。有研究显示,NLRP3可促进慢性阻塞性肺疾病、DN及动脉粥样硬化等疾病的进展,同时可作为潜在的治疗靶点^[4-5, 13]。如抑制NLRP3激活可显著降低DN的炎症反应,改善肾功能及预后^[5]。但NLRP3炎性小体是否参与了AP的发生,同时与病情严重程度及预后关系如何,目前尚不清楚。本研究中,随着AP患者病情严重程度的增加,患者PBMC中NLRP3、Caspase-1 mRNA及外周血IL-1 β 、IL-18

水平均显著升高。由此推断,AP患者PBMC受到刺激后,可激活NLRP3炎性小体,进一步促进下游炎性信号通路的激活。以往研究显示,炎症可促进细胞焦亡,而细胞焦亡是引起组织器官功能障碍的主要机制之一。在细胞焦亡通路中,Caspase-1是重要的剪切酶,可激活细胞焦亡途径,抑制Caspase-1活性可显著减轻细胞焦亡^[14]。本研究结果显示,AP患者随着体内炎症反应的显著增强,PBMC的Caspase-1 mRNA及剪切体Caspase-10和Caspase-20表达明显升高,其可能是引起AP患者多器官功能障碍的重要原因之一。进一步对AP患者临床结局进行分析,结果显示死亡组患者NLRP3炎性小体及下游Caspase-1、IL-1 β 、IL-18显著升高,可能对AP患者预后具有一定的预测价值。就NLRP3炎性小体做ROC曲线,分析其对AP患者病情严重程度的预测价值,结果显示,其ROC曲线的AUC较大,预测价值较高。NLRP3炎性小体对发起炎症反应及进一步放大起重要作用,有研究显示,抑制NLRP3炎性小体活性及表达,可显著降低体内炎性细胞因子水平,从而降低炎症反应^[15]。NLRP3炎性小体不仅与AP患者发病及评估病情严重程度有关,同时还可能为AP的治疗提供新的靶点。

综上所述,NLRP3炎性小体参与了AP患者的炎症反应,其可能与AP患者病情进展密切相关,但有关NLRP3炎性小体在AP中的免疫调节机制及细胞焦亡在其中的作用还有待于进一步研究。AP患者NLRP3炎性小体水平,可能成为AP患者病情严重程度评估的有效指标。

参考文献

- [1] Chung WS, Lin CL. Incidence and risk of acute coronary syndrome in patients with acute pancreatitis: A nationwide cohort study[J]. Pancreatolgy, 2017, 17(5): 675-680.
- [2] 郭志国,辛毅. 急性胰腺炎发病机制研究新观点[J]. 中国全科医学, 2018, 21(20): 2400-2403.
- [3] 李培磊,刘芳,傅志仁. NLRP3炎性小体在器官缺血再灌注损伤中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(2): 177-180.
- [4] 何子凡,高岩,王晓玲,等. NLRP3炎性小体在慢性阻塞性肺疾病患者机体炎症反应中作用的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(2): 119-123.
- [5] 谢雯丽,石昕,孔维玮,等. 颈动脉粥样硬化患者外周血单核细胞NLRP3炎性小体表达的研究[J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(12): 1300-1305.
- [6] 王春友,李非. 急性胰腺炎诊治指南(2014)[J]. 浙江医学, 2015, 31(1): 7-10.

- [7] Yang L, Liu J, Xing Y, *et al.* Comparison of BISAP, Ranson, MCTSI, and APACHE II in predicting severity and prognoses of hyperlipidemic acute pancreatitis in Chinese patients[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2016, 2016: 1834256.
- [8] Zhang C, Wang Y, Fu W, *et al.* A meta-analysis on the effect of ulinastatin on serum levels of C-reactive protein, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in asian patients with acute pancreatitis[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(3): 118-124.
- [9] Xu KY, Wu CY, Tong S, *et al.* The selective Nlrp3 inflammasome inhibitor Mcc950 attenuates lung ischemia-reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3031-3037.
- [10] Hao HP, Cao LJ, Jiang CT, *et al.* Farnesoid X receptor regulation of the NLRP3 inflammasome underlies cholestasis-associated sepsis[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 856-867. e5.
- [11] Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, *et al.* Role of the NLRP3 inflammasome in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 158.
- [12] Lasithiotaki I, Tsitoura E, Samara KD, *et al.* NLRP3/Caspase-1 inflammasome activation is decreased in alveolar macrophages in patients with lung cancer[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205242.
- [13] 杨可来尔, 匡洪宇. NLRP3 炎性小体与糖尿病肾病[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2018, 38(4): 271-274.
- [14] Sun W, Zeng C, Liu S, *et al.* Ageratina adenophora induces mice hepatotoxicity via ROS-NLRP3-mediated pyroptosis[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16032.
- [15] 韩浩贤, 王虹艳, 曲鹏, 等. NLRP3 与 NOD2 受体激活对下游炎症因子表达的影响[J]. *重庆医学*, 2016, 45(23): 3182-3184.

Expression and clinical significance of NLRP3 inflammasome in patients with acute pancreatitis

XIA Bing-jie, QIANG Zhan-rong, LI Gui-xian, QIN Zhen-mei, LUO Xue-ping (*Department of Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541199, China*)

Abstract: To study the expression and clinical significance of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome in patients with acute pancreatitis (AP), 160 patients with AP were divided into mild AP (MAP) group (52 cases), moderately severe AP (MSAP) group (50 cases) and severe AP (SAP) group (58 cases) according to the severity of AP, and survival group (135 cases) and death group (25 cases) according to the clinical outcome. The mRNA and protein levels of *NLRP3* and *Caspase-1* in PBMC were measured by RT-PCR and Western blotting. The levels of related cytokines (IL-1 β , IL-18) were detected by ELISA. The differences of the above indicators among different groups were compared and the predictive value of *NLRP3* regarding the severity of disease was evaluated. The results showed that the mRNA and protein levels of *NLRP3*, the mRNA levels of *Caspase-1* and the protein levels of Cleaved-Caspase-10 and Cleaved-Caspase-20, and the levels of IL-1 β , IL-18 in peripheral blood in different severity groups were significantly different ($P < 0.05$). Among them, the levels of the above indicators in the SAP group were the highest, followed by the MASP group, and with the MAP group were the lowest. The levels of *NLRP3*, *Caspase-1* mRNA and IL-1 β , IL-18 in peripheral blood in the death group were significantly higher than those in the survival group ($P < 0.05$). The expression of *NLRP3* mRNA in PBMC of AP patients was significantly positively correlated with *Caspase-1* mRNA, IL-1 β and IL-18 in peripheral blood ($r = 0.742, P = 0.000; r = 0.610, P = 0.015; r = 0.570, P = 0.019$); meanwhile, there was a significant positive correlation with severity score of AP [modified CT severity index (MCTSI) score, Ranson score and acute physiology and chronic health evaluation (APACHE II) score] ($r = 0.705, P = 0.004; r = 0.690, P = 0.006; r = 0.638, P = 0.012$). Receiver operating characteristic (ROC) curves analysis showed that the AUC of *NLRP3* was 0.851 [95% confidence interval (CI) 0.778-0.923], and the optimal operating point was 2.25, which had 76.00% sensitivity and 85.71% specificity in predicting the severity of AP patients, indicating ROC curves analysis was better than IL-1 β and IL-18 level determination. Together, *NLRP3* is involved in the inflammatory response in patients with AP and there is certain application value for predicting the severity of AP patients.

Key words: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors family pyrin domain containing 3; interleukin 1 β ; interleukin 18; acute pancreatitis