

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.26.009

NLRP3 炎性小体对冠心病患者血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平的影响*

胡龙江¹, 周音频^{1 Δ} , 曹运兰², 吕 湛³, 蓝运竟¹, 宁 琳¹, 向立权¹, 肖 鹏¹

(1. 重庆市涪陵中心医院心血管内科 408000; 2. 贵州省人民医院心血管内科, 贵阳 550002;

3. 川北医学院附属医院心血管内科, 四川南充 637000)

[摘要] **目的** 探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体对冠心病患者血浆白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18、转化生长因子- β (TGF- β) 水平的影响。**方法** 入选健康对照组 30 例及冠心病组 60 例, 采用 RT-qPCR、Western blot 法分别检测外周血单个核细胞(PBMCs)中 NLRP3、凋亡相关微粒蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1 (caspase-1) mRNA 及蛋白表达水平, ELISA 法检测血浆中 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平。**结果** ASC mRNA、NLRP3、ASC、caspase-1 表达水平及血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平在两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。冠心病组患者 NLRP3 mRNA 和 caspase-1 mRNA 均与 IL-18 呈正相关($r = 0.327, 0.274, P = 0.011, 0.031$), ASC 与年龄、IL-1 β 、IL-18 呈正相关($r = 0.370, 0.467, 0.403, P = 0.024, 0.009, 0.027$); caspase-1 与吸烟、IL-18 呈正相关($r = 0.613, 0.414, P < 0.01, P = 0.023$), IL-1 β 与 TGF- β 呈负相关($r = -0.287, P = 0.026$)。**结论** 以 NLRP3 炎性小体为中心的 NLRP3-ASC-caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路可能在冠心病的发生发展过程中发挥重要作用, 但该通路并未促进冠心病患者抗炎因子 TGF- β 的表达。

[关键词] NLRP3 炎性小体; 冠心病; 白细胞介素-18; 白细胞介素-1 β ; 转化生长因子- β

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)26-3394-04

Effect of NLRP3 inflammasome on plasma interleukin-1 β , interleukin-18 and transforming growth factor- β levels in patients with coronary heart disease*

HU Longjiang¹, ZHOU Yinpin^{1 Δ} , CAO Yunlan², LV Zhan³, LAN Yunjing¹,
NING Lin¹, XIANG Liquan¹, XIAO Peng¹

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Fuling Central Hospital, Fuling, Chongqing 408000, China;

2. Department of Cardiovascular Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;

3. Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome on plasma interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18) and transforming growth factor- β (TGF- β) levels in the patients with coronary heart disease (CHD). **Methods** Thirty healthy controls and 60 patients with CHD were recruited. The expression levels of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC) and caspase-1 mRNA as well as protein in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were detected by adopting RT-qPCR and Western blot respectively, and the levels of plasma IL-1 β , IL-18 and TGF- β were detected by the ELISA method. **Results** The expression levels of NLRP3, ASC and caspase-1 in PBMCs, and plasma IL-1 β , IL-18, TGF- β had statistical difference between the CHD group and control group ($P < 0.05$). Both NLRP3 mRNA and caspase-1 mRNA were positively correlated with IL-18 in the CHD group ($r = 0.327, 0.274, P = 0.011, 0.031$); ASC was positively correlated with age, IL-18 and IL-1 β in the CHD group ($r = 0.370, 0.467, 0.403, P = 0.024, 0.009, 0.027$); caspase-1 was positively correlated with smoking and IL-18 in the CHD group ($r = 0.613, 0.414, P < 0.01, P = 0.023$); IL-1 β was negatively correlated with TGF- β in the CHD group ($r = -0.287, P = 0.026$). **Conclusion** NLRP3-ASC-caspase-1-IL-1 β /IL-18 signal pathway with the NLRP3 inflammasome as the center may play an important role in the occurrence and development of CHD, but this signal pathway does not promote the expression of anti-inflammatory cytokine TGF- β in the patients with CHD.

[Key words] NLRP3 inflammasome; coronary heart disease; interleukin-18; interleukin-1 β ; transforming growth factor- β

随着人民生活水平的不断提高,心血管疾病的发病率逐年增加,特别是在发达国家及部分发展中国家。因此,进一步明确心血管疾病的发病机制及寻找新的心血管疾病防治策略迫在眉睫。有研究表明,局部和全身炎症反应及自身免疫在心血管疾病发生发展过程中起着重要作用^[1]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体是一种包含 NLRP3、凋亡相关微粒蛋白 (ASC)、半胱氨酸蛋白酶-1 (caspase-1) 的蛋白质复合物,在机体正常免疫反应过程中起重要作用,是炎症-免疫的桥梁,在心血管疾病中的作用是当前研究的热点^[2-3],它能促进炎性因子白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 的产生^[4],参与多种心血管疾病的发生发展,而当 IL-1 β 、IL-18 作为炎性因子参与机体炎症反应,机体抗炎因子如 TGF- β 亦会发生相应变化。本研究通过检测冠心病患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 NLRP3 炎性小体的表达情况及血浆 IL-1 β 、IL-18、转化生长因子- β (TGF- β) 的水平变化,进一步探讨 NLRP3 炎性小体与冠心病发生发展的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 3—9 月重庆市涪陵中心医院健康体检中心的健康体检者 30 例 (对照组),心血管内科收治的冠心病患者 60 例 (冠心病组),年龄均在 40~80 岁,对照组肝、心、肾、肺检查均正常,排除自身免疫性疾病、代谢性疾病、急慢性感染性疾病、近期创伤、肿瘤、正在使用抗炎药物者,排除有遗传病及传染病家族史者。冠心病组符合冠心病诊断依据 (行冠状动脉造影术证实),排除移植血管病变者,排除严重心、肝、肾功能不全等慢性并发症者,余排除标准同对照组。该研究获重庆市涪陵中心医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 基本临床资料采集 研究对象入组后,统计性别、年龄、吸烟史、平均动脉压 (MAP)、体质量指数 (BMI)、空腹血糖 (FPG)、血脂等临床资料,所有研究对象入组后次日 06:00 时抽取外周静脉血 20 mL,取 4 mL 全血离心,抽取血浆,置于-80 °C 冰箱中备用,剩余全血,注入肝素抗凝管,Ficoll-Hypaque 密度梯度分离出 PBMCs。

1.2.2 RNA 提取及逆转录 采用 RNAiso plus 试剂盒提取人 PBMCs 总 RNA,测定其浓度并检测纯

度。利用 PrimeScript™ RT reagent Kit 进行逆转录合成 cDNA,引物序列由 TaKaRa 公司合成,见表 1。

1.2.3 RT-qPCR 反应 应用 SYBR Premix Ex Taq™ II 荧光定量试剂盒进行实时定量 PCR 反应,反应体系及条件参照说明书,反应结束后,作扩增及溶解曲线,采用 Ct 值计算目的基因的相对表达量: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{病例组}} - Ct_{\text{GAPDH}}) - (Ct_{\text{对照组}} - Ct_{\text{GAPDH}})$,病例组目的基因 mRNA 的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.4 Western blot 按照 Western blot 及 IP 细胞裂解液提取 PBMCs 总蛋白,并采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μ g 蛋白进行 8% SDS-PAGE 凝胶电泳,裁膜,转膜,BSA-TBS 封闭液封闭 4 h,浸入含蛋白 NLRP3 (1 : 100)、ASC (1 : 1 000)、caspase-1 (2.5 μ g/mL)、内参蛋白 GAPDH (1 : 500) 的一抗稀释液中,在 4 °C 孵育过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 5 000),在室温孵育 1 h,洗膜,凝胶成像分析系统显影分析。

1.2.5 ELISA 检测 应用 ELISA 法测定血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平,严格参照说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,计量资料符合正态分布者,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用独立样本 *t* 检验,非正态分布、方差不齐的计量资料数据用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两两比较采用非参数 Mann-Whitney 秩和检验;偏态分布资料与其他变量之间的相关性分析采用 Spearman 相关;计数资料用率表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组基本资料及血脂、血糖水平比较 两组性别、吸烟、年龄、BMI、FPG、三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TCH)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇 (VLDLC)、差异无统计学意义 ($P > 0.05$);MAP 在冠心病组高于对照组,高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 在对照组高于冠心病组 ($P < 0.05$),见表 2。

2.2 两组血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平变化比较 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 在冠心病组高于对照组 ($P < 0.05$),见表 3。

2.3 两组 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 水平比较 PBMCs 中 ASC mRNA 在冠心病组中的表达高于对照组 ($P < 0.05$),见图 1。

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
NLRP3	5'-AAA GCC AAG AAT CCA CAG TGT AAC-3'	5'-TTG CCT CGC AGG TAA AGG T-3'
ASC	5'-GGA TGC TCT GTA CGG GAA GG-3'	5'-CGC ATC TTG CTT GGG TTG-3'
caspase-1	5'-AGG CAT GAC AAT GCT GCT ACA A-3'	5'-TGT GCA AAT GCC TCC AGC TC-3'
GAPDH	5'-CTT TGG TAT CGT GGA AGG ACT C-3'	5'-GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC T-3'

表 2 两组间基本情况及血脂、血糖水平变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	性别 (男/女)	吸烟 (是/否)	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	MAP (mm Hg)	FPG (mmol/L)	TG (mmol/L)	TCH (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	VLDLC (mmol/L)
对照组	30	16/14	5/25	59.40±8.80	24.24±2.55	90.83±11.64	4.70±0.63	1.29±0.55	4.27±1.05	1.24±0.30	2.73±0.86	0.59±0.25
冠心病组	60	41/19	21/39	58.80±8.75	24.73±3.55	98.62±13.10	4.74±0.61	1.49±0.76	4.29±1.29	1.10±0.26	2.87±1.10	0.68±0.34
χ^2/t		1.938	3.272	0.306	-0.046	-2.754	-0.293	-1.279	-0.115	2.161	-0.546	-1.279
P		0.174	0.087	0.760	0.963	0.007	0.770	0.204	0.909	0.034	0.586	0.204

表 3 两组血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平变化比较

组别	n	IL-1 β (ng/L, $\bar{x}\pm s$)	IL-18 (ng/L, $\bar{x}\pm s$)	TGF- β [ng/L, M(P ₂₅ , P ₇₅)]
对照组	30	12.53±2.79	50.02±10.18	1 538.33(1 428.46, 1 690.65)
冠心病组	60	25.29±2.42	99.92±12.86	2 346.13(2 254.98, 2 841.56)
Z/t		-22.416	-18.535	-7.669
P		0.000	0.000	0.000

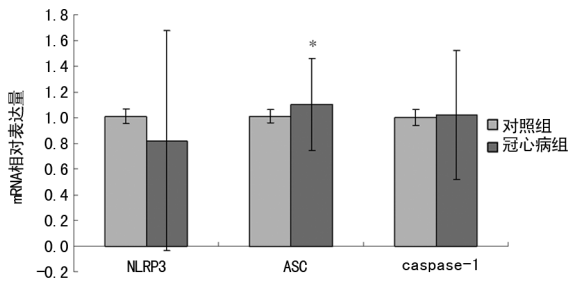
* : $P < 0.05$, 与对照组比较

图 1 两组 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 水平比较

2.4 两组 NLRP3、ASC、caspase-1 水平比较 PB-MCs 中 NLRP3、ASC、caspase-1 在冠心病组中的表达高于对照组($P < 0.05$), 见图 2、3。

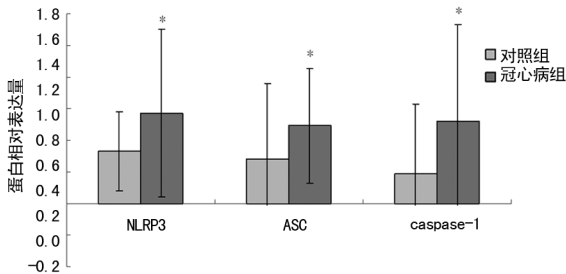
* : $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 两组 NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白水平比较

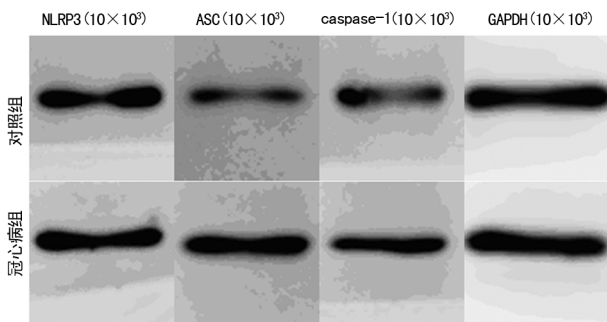


图 3 两组 Western blot 检测结果

2.5 两组 NLRP3、ASC、caspase-1 及其 mRNA 与其他各观察指标相关分析 对照组 caspase-1 mRNA 与 FPG 呈正相关($r = 0.394, P = 0.031$), NLRP3 与性

别呈正相关($r = 0.429, P = 0.020$), ASC 与 FPG 呈正相关($r = 0.405, P = 0.026$), caspase-1 与 MAP、FPG 呈正相关($r = 0.447, 0.396, P = 0.013, 0.030$); 冠心病组, NLRP3 mRNA 和 caspase-1 mRNA 均与 IL-18 呈正相关($r = 0.327, 0.274, P = 0.011, 0.031$), ASC 与年龄、IL-1 β 、IL-18 呈正相关($r = 0.370, 0.467, 0.403, P = 0.024, 0.009, 0.027$); caspase-1 与吸烟、IL-18 呈正相关($r = 0.613, 0.414, P < 0.01, P = 0.023$)。

2.6 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 之间相关分析 Spearman 相关分析显示 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 在对照组无相关性; 而在冠心病组, IL-1 β 与 TGF- β 呈负相关($r = -0.287, P = 0.026$)。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性、渐进性炎症性疾病, 炎症反应在动脉粥样硬化的发生、发展及粥样斑块的破裂、继发性血栓的形成过程中发挥着重要作用。在冠心病患者中, 粥样硬化斑块是贯穿于冠心病的关键点。同样, 炎症反应促进冠心病的发生发展及急性冠状动脉综合征的发生。NLRP3 炎症小体具有调控机体慢性炎症反应的功能, NLRP3 是其最核心的组成部分, 包括中间的核苷酸寡聚结构域、C 端的亮氨酸重复序列及 N 端的热蛋白结构域, ASC 是其衔接蛋白, 与 NLRP3 及 caspase-1 前体结合, 并介导 NLRP3 激活 caspase-1, 而 caspase-1 是其效应蛋白, 它被激活后促使促炎因子如 IL-1 β 和 IL-18 的前体转化为活性形式^[4-5]。

IL-1 β 是经典的炎症因子, 参与动脉粥样硬化相关的免疫与炎症反应, 在冠心病的发生发展及斑块的破裂过程中起着重要作用^[6], 其机制包括: 促进血管平滑肌细胞迁移及增殖^[7]; 促进血管内皮细胞增生及细胞外基质沉积; 促进泡沫细胞形成; 上调 CD40 及其配体的表达^[8]; 促进免疫反应及免疫调节; 促进动脉血栓形成。

IL-18 是“多效能”炎症因子, 在免疫及炎症反应过程中扮演着重要角色, 它不仅通过诱导 INF- γ 的生成; 诱导血管平滑肌细胞的增殖和迁移及血管内皮细胞的凋亡; 促进泡沫细胞的形成; 刺激血管壁细胞 IL-1 β 、IL-8 等细胞因子的表达; 促进单核巨噬细胞基质金属蛋白酶的表达及凋亡等机制促进冠心病的发生发展, 而且增加动脉粥样斑块的不稳定性^[9], 促进易损斑块的形成, 参与易损斑块的溃疡、破裂、血栓的形

成^[10]。IL-18 是冠心病的独立危险因素,并可对冠心病患者病情的发展及严重冠脉事件作出预测^[11-12]。

TGF- β 是具有多种生物学功能的多肽生长因子,在心血管系统中亦起重要作用。TGF- β 具有抑制炎症反应的作用,而在动脉粥样硬化疾病中,TGF- β 在机体过度表达,其通过多种途径使其对机体有利的生物学作用降低^[13],反而通过促进平滑肌细胞的增生、迁移、分化^[14-15];促进细胞外基质的合成与积聚,抑制细胞外基质的降解^[13-14];诱导血管重构^[13-14];促进血栓形成^[14];增加纤维帽厚度等机制促进冠心病的发生发展。

本课题组通过检测 PBMCs 中 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 的表达,发现对照组 PBMCs 中 ASC mRNA 水平显著低于冠心病组,提示 NLRP3 炎性小体在患者病患者中部分组分在转录水平即表达增加,为冠心病患者激活 NLRP3 炎性小体奠定了基本条件。虽然 NLRP3 及 caspase-1 mRNA 的表达在冠心病患者中未见明显增高,但均与 IL-18 呈正相关,提示 NLRP3 炎性小体在转录水平即有促进炎症因子 IL-18 表达的倾向。本课题组进一步提取 PBMCs 中总蛋白,并检测 NLRP3 炎性小体各组分浓度,同时测定 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 在血浆中的水平,发现冠心病患者中 NLRP3、ASC、caspase-1 浓度及血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平均高于对照组 ($P < 0.05$),提示 PBMCs 中 NLRP3 炎性小体以及血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平与冠心病的发生发展密切相关;且 ASC 在冠心病组与年龄、IL-1 β 、IL-18 呈正相关,caspase-1 在冠心病组与吸烟、IL-18 呈正相关,IL-1 β 在冠心病组与 TGF- β 呈负相关,提示在冠心病患者中,发挥正常免疫功能的 NLRP3 炎性小体的调控失去平衡性,它被激活后,导致促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-18 过量生成,继而通过下游的信号转导通路产生炎症瀑布反应,导致冠状动脉炎性损伤。但在冠心病患者中,促炎因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达并未直接促进抗炎因子 TGF- β 的表达,冠心病患者血浆 TGF- β 的高表达,与其他途径密切相关,本课题组将进一步研究。

综上所述,PBMCs 中 NLRP3 炎性小体以及血浆 IL-1 β 、IL-18、TGF- β 水平与冠心病的发生发展密切相关,以 NLRP3 炎性小体为中心的 NLRP3-ASC-caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路可能在冠心病的发生发展过程中发挥重要作用,但该通路并未促进冠心病患者抗炎因子 TGF- β 的表达,血浆 TGF- β 高表达可能与其他途径密切相关。因此,进一步研究 NLRP3-ASC-caspase-1-IL-1 β /IL-18 信号通路以及 TGF- β 的激活及调控机制,进而针对该通路及 TGF- β 的干预有可能成为防治冠心病潜在而有效的策略。

参考文献

[1] LUKENS J R, KANNEGANTI T D. Beyond canonical in-

flammasomes: emerging pathways in IL-1-mediated autoinflammatory disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2014, 36(5):595-609.

- [2] OZAKI E, CAMPBELL M, DOYLE S L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives[J]. *J Inflamm Res*, 2015, 8(1):15-27.
- [3] CAO Z, LI Y, CHEN R, et al. Effect of NLRP3 inflammasome on vascular diseases[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2016, 41(11):1232-1236.
- [4] JO E K, KIM J K, SHIN D M, et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2):148-159.
- [5] SHAO B Z, XU Z Q, HAN B Z, et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6:262.
- [6] 乔琛琛, 高大胜. 白细胞介素-1 β 与冠心病[J]. *国际心血管病杂志*, 2012, 39(1):7-10.
- [7] EUN S Y, KO Y S, PARK S W, et al. IL-1 β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 72:108-117.
- [8] SHUBAIR M K, LUTFI M F, BOLAD A K, et al. IL-1 β level in Sudanese patients with atherosclerotic coronary heart disease[J]. *Int J Med Biomed Res*, 2012, 1(1):73-78.
- [9] BOUKI K P, KATSAFADOS M G, CHATZOPOULOS D N, et al. Inflammatory markers and plaque morphology: an optical coherence tomography study [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 154(3):287-292.
- [10] 李巧汶, 张小勇, 李志樑, 等. 白细胞介素 18 对动脉粥样硬化斑块形态变化影响的实验研究[J]. *医学临床研究*, 2013, 30(3):479-482.
- [11] LI Q W, LI Z L, ZHANG X Y, et al. Evaluated plasma interleukin-18/interleukin-10 ratio is a risk factor for acute coronary syndromes in patients with stable angina pectoris[J]. *Cardiol J*, 2014, 21(1):83-88.
- [12] 周军, 邓桂元, 杨天伦, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆 IL-18 水平与全球急性冠状动脉事件注册评分的相关性[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2014, 39(6):570-576.
- [13] REDONDO S, NAVARRO-DORADO J, RAMAJO M, et al. The complex regulation of TGF- β in cardiovascular disease[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2012, 8:533-539.
- [14] TOMA I, MCCAFFREY T A. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1):155-175.
- [15] SUWANABOL P A, SEEDIAL S M, SHI X A, et al. Transforming growth factor- β increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways[J]. *J Vasc Surg*, 2012, 56(2):446-454.