

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*

谢雯丽¹ 石昕^{1,2} 孔维玮¹ 陈东³ 曲鹏¹

[摘要] 目的:检测重度颈动脉粥样硬化患者外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体表达水平,探讨 NLRP3 炎性小体在颈动脉粥样硬化形成中的作用。方法:收集重度颈动脉粥样硬化行颈动脉内膜剥脱术(CEA)患者 30 例为观察组,无颈动脉粥样硬化形成的健康者 20 例为对照组。采静脉血 20 ml,采用 Real-time PCR 检测外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体各组分、IL-1 β 、IL-18 mRNA 表达,Western-blot 法检测其蛋白表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆 IL-1 β 和 IL-18 水平。应用多元线性逐步回归分析外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体各组分、IL-1 β 、IL-18 mRNA 及血浆 IL-1 β 、IL-18 的危险因素,并采用 Pearson 相关分析其与颈动脉 mean-IMT、max-IMT 的关系。结果:观察组外周血单核细胞 NLRP3 mRNA(5.51 $\pm$ 2.52)、Caspase-1 mRNA(3 467.84 $\pm$ 1 057.99)、IL-1 β mRNA(1 852.04 $\pm$ 1 503.22)、IL-18 mRNA(5.67 $\pm$ 3.15)表达量,血浆 IL-1 β (31 701.63 $\pm$ 1 930.16)pg/L、IL-18(332.70 $\pm$ 35.61)ng/L 水平均显著高于对照组(均 $P<0.001$)。观察组外周血单核细胞 ASC mRNA 表达量(84.17 $\pm$ 25.78)与对照组(73.54 $\pm$ 10.30)差异无统计学意义。多元线性逐步回归分析显示,高血压、LDL-C、TG、UA 是激活 NLRP3 炎性小体表达及血浆 IL-1 β 、IL-18 水平的重要危险因素。观察组颈部超声 mean-IMT 与外周血单核细胞 NLRP3 mRNA($r=0.380$, $P=0.038$)、Caspase-1 mRNA($r=0.381$, $P=0.038$)、血浆 IL-1 β ($r=0.432$, $P=0.017$)、血浆 IL-18($r=0.441$, $P=0.015$)呈正相关。观察组颈部超声 max-IMT 与血浆 IL-1 β ($r=0.419$, $P=0.021$)、血浆 IL-18($r=0.382$, $P=0.037$)呈正相关。结论:重度颈动脉粥样硬化患者外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体活化,并与颈动脉粥样硬化的严重程度相关,提示 NLRP3 炎性小体可能参与了颈动脉粥样硬化发生发展,LDL-C、TG、UA、高血压可能是激活 NLRP3 炎性小体表达的重要危险因素。

[关键词] NLRP3 炎性小体; 颈动脉粥样硬化; 血脂; 血尿酸; 内膜中膜厚度

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.12.014

[中图分类号] R543.1 **[文献标志码]** A

Expression of NLRP3 inflammasome in peripheral blood mononuclear cells of patients with carotid atherosclerosis

XIE Wenli¹ SHI Xin^{1,2} KONG Weiwei¹ CHEN Dong³ QU Peng¹

(¹Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, China, 116023; ²Department of Cardiology, The Fifth People Hospital, Dalian; ³Department of Neurosurgery, Dalian Centre Hospital)

Corresponding author: QU Peng, E-mail: qupeng777@aliyun.com

Abstract Objective: To test the expression level of the NLRP3 inflammasome mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells from patients with severe carotid atherosclerosis and to explore the effect of NLRP3 inflammasome in carotid atherosclerosis. **Method:** The research group consisted of 30 patients who were categorized as having severe carotid atherosclerosis waiting for CEA. And another 20 patients with no carotid stenosis and coronary artery stenosis were categorized as the control group. We collected 20 ml venous blood to get the mononuclear cells and plasma. Real time PCR was used to analyze the expression level of the NLRP3 inflammasome, IL-1 β , IL-18 mRNA in PBMCs and Western-blot was used to investigate the expression levels of them. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to explore the IL-1 β and IL-18 in plasma. Then t-test was applied to compare the differences of these indicators in each group. Multiple linear stepwise regression was used to analyze the risk factors of the expression of NLRP3 inflammasome, IL-1 β , IL-18 mRNA in PBMCs, and plasma IL-1 β , IL-18. Pearson correlation was used to evaluate the relationship between NLRP3 inflammasome, IL-1 β , IL-18 mRNA in PBMCs and mean-IMT, max-IMT. **Result:** The expression of NLRP3 mRNA (5.51 $\pm$ 2.52), Caspase-1 mRNA(3 467.84 $\pm$ 1 057.99), IL-1 β mRNA(1 852.04 $\pm$ 1 503.22), IL-18 mRNA(5.67 $\pm$ 3.15) in PBMCs and

* 基金项目:辽宁省自然科学基金(No:2013023025)

¹大连医科大学附属第二医院心内科(大连,116023)

²大连市第五人民医院心内科

³大连市中心医院综合神经外科

通信作者:曲鹏;E-mail:qupeng777@aliyun.com

plasma IL-1 β level ($3\,1701.63 \pm 1\,930.16$ pg/l), IL-18 (332.70 ± 35.61) ng/l were significantly higher in CEA group than those in the control group ($P < 0.001$), while there was no difference of ASC mRNA between CEA group (84.17 ± 25.78) and the control group (73.54 ± 10.30). Multiple linear stepwise regression analysis showed that hypertension, LDL-C, TG, UA were the influencing factors of the expression of NLRP3 inflammasome and the level of plasma IL-1 β , IL-18. In CEA patients, Pearson correlation analysis indicated significant correlation between mean-IMT and NLRP3 mRNA ($r = 0.380$, $P = 0.038$), Caspase-1 mRNA ($r = 0.381$, $P = 0.038$), plasma IL-1 β ($r = 0.432$, $P = 0.017$), plasma IL-18 ($r = 0.441$, $P = 0.015$). And then there were significant correlations between max-IMT and plasma IL-1 β ($r = 0.41$, $P = 0.021$), plasma IL-18 ($r = 0.382$, $P = 0.037$) as well. **Conclusion:** NLRP3 inflammasome in PBMCs is activated in patients with severe carotid atherosclerosis. Meanwhile, there is a close relationship between the expression of NLRP3 inflammasome and severity of carotid atherosclerosis. NLRP3 inflammasome in PBMCs may play a critical role in the process of atherosclerosis, LDL-C, TG, UA and hypertension are important risk factors which could activate NLRP3 inflammasome.

Key words NLRP3 inflammasome; carotid atherosclerosis; lipid; uric acid; intima media thickness

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的病理基础,除血脂异常、高血压等明确的危险因素外,炎症免疫起关键作用。在动脉粥样硬化形成过程中,巨噬细胞通过产生多种生物活性物质参与病变进展,其主要来源之一是外周血单核细胞。NLRP3 能被胆固醇结晶或尿酸结晶等配体激活,募集凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 及胱天蛋白酶 Caspase-1 前体,形成多蛋白复合体-NLRP3 炎性小体,其在形成过程中诱导 Caspase-1 自动装配和活化,进而对多种炎症因子的前体形式如 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 进行切割,成熟后释放到胞外,引起炎症反应^[1]。Zheng 等^[2]发现 NLRP3 炎性小体在冠心病患者主动脉过度表达;Wang 等^[3]发现外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体及其下游炎症因子在急性冠状动脉综合征患者较正常人表达增加,并与冠状动脉(冠脉)粥样硬化的严重程度及急性心肌梗死后心室重构等有关。

目前针对 NLRP3 炎性小体与动脉粥样硬化关系的研究大部分集中于人和动物模型的冠脉,对颈动脉粥样硬化的研究甚少。由于颈动脉位置表浅且相对固定,通过超声观察颈动脉粥样硬化并预测全身动脉粥样硬化病变情况已被广泛应用。NLRP3 作为单核巨噬细胞胞质内的固有免疫模式识别受体,特别是外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体是否参与颈动脉粥样硬化的发生发展,并受血脂、血尿酸等危险因素的影响? 本研究通过检测重度颈动脉粥样硬化患者外周血单核细胞中 NLRP3 炎性小体的表达水平,探讨其在颈动脉粥样硬化发生发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 对象

收集 2013-10—2014-04 大连医科大学附属第二医院及大连市中心医院行颈动脉内膜剥脱术(carotid endarterectomy, CEA)患者 30 例为观察组。经体格检查、常规实验室检查,行冠脉造影及颈部血管超声证实无动脉粥样硬化形成的健康者

20 例为对照组。本研究得到大连医科大学附属第二医院伦理委员会及大连市中心医院伦理委员会批准,所有受试者均签订知情同意书。入选标准:观察组患者均经颈部血管超声确定颈动脉狭窄 $\geq 70\%$,且符合 2008 年《颅外段颈动脉狭窄治疗指南》规定的 CEA 手术指征^[4]:6 个月内 1 次或多次短暂性脑缺血发作,且颈动脉狭窄度 $\geq 70\%$;6 个月内 1 次或多次轻度非致残性卒中发作,症状或体征持续 > 24 h 且颈动脉狭窄度 $\geq 70\%$,部分患者同时行颈部血管造影或磁共振血管造影检查。排除标准:2 周内脑梗死病史;有明显的肝、肾或心功能衰竭、肿瘤、全身感染、自身免疫性疾病等;发病前 1 个月内有手术史;6 个月以内有急性心肌梗死病史;患有血管炎性病变,处于活动期,红细胞沉降率 > 30 ml/h;服用炎症抑制性药物、免疫抑制剂或激素类药物者;血常规化验白细胞计数异常者;任何原因的出凝血障碍;合并无法耐受全麻手术禁忌者。

1.2 方法

1.2.1 一般资料采集 采集年龄、性别、高血压病史、糖尿病病史、脑血管病病史、吸烟史、饮酒史、神经系统症状史、体格检查、药物治疗史等临床基本资料。

1.2.2 超声检查 采用美国 GE 公司 LOGIQE9 彩色多普勒超声诊断仪,9.0 MHz 高频线阵探头,由固定的专业超声医生检查。患者仰卧位,颈后垫枕,头偏向检查对侧,从锁骨上窝起沿颈动脉由下向上以纵向和横向扫查双侧颈总动脉远端、颈内动脉近端、颈外动脉、颈动脉球部前壁及后壁,观察血管管壁是否光滑、有无斑块、斑块特点(数目、大小、回声、形态等)。颈动脉狭窄程度测量和分级方法:按照欧洲颈动脉手术实验(European Carotid Surgery Trial, ECST)^[5],即狭窄率 $= (1 - B/C) \times 100\%$ (B:最狭窄处血管直径;C:狭窄段原始血管直径)。狭窄程度分为轻度(狭窄率 $0 \sim 29\%$)、中度(狭窄率 $30\% \sim 69\%$)和重度狭窄(狭窄率 $70\% \sim 99\%$)、完全闭塞。内膜中膜厚度(intima-media thickness,

IMT)测量方法:测量双侧颈总动脉远端 1 cm 处、颈动脉球部及颈内动脉近端 1 cm 处内膜界面与中层外膜界面之间的距离即 IMT,均需测量 3 次取其平均值。最大 IMT(max-IMT)为颈内动脉或颈动脉球部最厚斑块处的 IMT^[6]。平均 IMT(mean-IMT)为双侧颈总动脉、颈内动脉 IMT 及最大 IMT 的平均值。

1.2.3 血液检测 所有受试者入院后次日清晨空腹采集前臂静脉血,使用 SYSMEX XE-2100 血细胞分析仪行血常规检测;西门子 ADVIA2400 全自动生化分析仪检测血糖、血脂、尿酸。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),使用 IL-1 β 和 IL-18 ELISA 检测试剂盒(eBioscience, USA),检测血浆 IL-1 β 、IL-18 浓度。

1.2.4 Real-time PCR 检测 分离血浆后采用 Ficoll-Hypaque 密度分离法提取外周血单核细胞按 E. Z. N. A DNA/RNA/Protein Isolation Kit (R-6734-01, Omega USA)说明书提取总 RNA。以提取的总 RNA 为模板,按照逆转录试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA)说明书以 42℃、50 min, 95℃、5 min, 5℃、5 min 进行逆转录反,合成 cDNA,于 -20℃中保存。应用软件 primer 5.0 设计引物和探针,由宝生物工程(大连)有限公司合成并检验,序列见表 1。使用 PrimeScript TM RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Code No. RR047A),以 37℃、15 min, 85℃、5 s, 4℃行 mRNA 反转录反应。反应后,使用 SYBR[®] Premix Ex Taq II (TliRNaseH Plus) (TaKaRa, Code No. RR820A/B)试剂盒进行 Real Time PCR 反应,反应条件:95℃预变性 10 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火及延伸 34 s,进行 40 个循环,循环结束后得到扩增曲线。使用实时定量 PCR 7500 仪(ABI 公司, USA)测定外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体 mRNA 表达,采用 2^{- Δ Ct}法,计算目的基因 mRNA 转录水平^[7-8]。

1.2.5 Western blot 检测 提取外周血单核细胞按 E. Z. N. A DNA/RNA/Protein Isolation Kit(R-6734-01, Omega USA)说明书提取总蛋白。取 80 μ g 蛋白质/泳道加入等体积 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白变性;100V 浓缩胶,150 V 分离胶,电泳后将 SDS-PAGE 凝胶转移入缓冲液中平衡 30 min,使用半干式免疫印迹法电转移 2.5 h 到硝酸纤维素膜(NC)上,NC 膜放入含 5%脱脂奶粉的封闭液中,4℃封闭过夜;NC 膜加入一抗:anti-NLRP3 antibody (LS-B5028, LifeSpan BioSciences, Inc. Seattle, WA, USA, 1:200 dilution), anti-ASC antibody (sc-33958, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:200 dilution), anti-

Caspase-1 antibody (LS-B3394, LifeSpan BioSciences Inc. USA, 1:250 dilution), anti-IL-1 β antibody (LS-C18827, Lifespan BioSciences, Inc. USA, 1:200 dilution), and anti-IL-18 antibody (LS-B2809, LifeSpan BioSciences, Inc. USA, 1:200 dilution)37℃孵育 1 h, TBST 洗膜 10~15 min $\times$ 3 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔 IgG, Abcam 1:2 500), 37℃孵化 1 h, TBST 洗膜 10~15 min $\times$ 3 次;使用 Western blotting 化学荧光检测系统(Perkin Elmer, NEL100001EA)激发荧光,显示于 X 光片,显影,定影后进行图像分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析。计量资料采用独立样本 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验;两连续变量相关性分析采用 Pearson 相关性检验;应用多元线性逐步回归进行多变量之间的相关性分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

患者一般临床资料见表 1、2。

表 1 对照组与 CEA 组超声指标

Table 1 Carotid ultrasound data of control group and CEA group

group		$\bar{x} \pm s$	
组别	狭窄率/%	mean-IMT /mm	max-IMT /mm
对照组(20 例)	0	0.72 $\pm$ 0.05	0.74 $\pm$ 0.06
CEA 组(30 例)	80.78 $\pm$ 8.92	1.87 $\pm$ 0.22 ¹⁾	4.63 $\pm$ 1.18 ¹⁾

与对照组比较,¹⁾ P<0.05。

2.2 NLRP3 炎性小体各组分、IL-1 β 、IL-18mRNA 及血浆 IL-1 β 、IL-18 水平

CEA 组外周血单核细胞 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18mRNA 表达升高,血浆 IL-1 β 、IL-18 水平明显增高(均 P<0.05);而 CEA 组外周血单核细胞 ASC mRNA 与对照组比较差异无统计学意义。见图 1、2。

2.3 NLRP3 炎性小体各组分及 IL-1 β 、IL-18 蛋白表达

CEA 组外周血单核细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达升高。见图 3。

2.4 线性回归分析结果

分别以外周血单核细胞 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18mRNA、血浆 IL-1 β 、IL-18 为因变量,年龄、性别、高血压、糖尿病、吸烟、饮酒、WBC、单核细胞、TC、TG、LDL-C、HDL-C、Apo-A1、Apo-B、LDL-C/HDL-C、UA 为自变量,进行多元线性逐步回归分析,结果见表 3。

表 3 线性回归分析结果				
Table 3 Results of multiple linear stepwise regression				
变量	B	β	t 值	P 值
NLRP3 mRNA				
LDL-C/HDL-C	0.875	0.278	3.149	0.003
TG	1.126	0.394	2.859	0.006
UA	0.009	0.004	2.411	0.02
ASC mRNA				
单核细胞	50.074	19.012	2.634	0.011
Caspase-1 mRNA				
TG	864.403	180.618	4.786	0
UA	6.602	1.791	3.685	0.001
LDL-C	543.876	180.034	3.021	0.004
IL-1 β mRNA				
LDL-C/HDL-C	393.641	145.245	2.71	0.009
IL-18 mRNA				
UA	0.016	0.005	3.388	0.001
TG	1.429	0.466	3.067	0.004
LDL-C	1.161	0.464	2.501	0.016
Plasma IL-1 β				
高血压	7978.355	1786.022	4.467	0
TG	5006.543	1051.939	4.759	0
UA	23.139	9.986	2.317	0.025
Plasma IL-18				
高血压	31.833	12.42	2.563	0.014
LDL-C/HDL-C	15.933	4.944	3.223	0.002
UA	0.185	0.07	2.652	0.011
TG	18.1	7.464	2.425	0.019

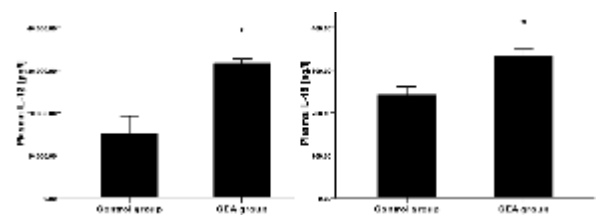


图 2 血浆 IL-1 β 与 IL-18 水平
Figure 2 Plasma IL-1 β and IL-18

2.5 相关性分析结果

CEA 组外周血单核细胞 NLRP3、Caspase-1 mRNA 与 mean-IMT 呈正相关 ($P<0.05$), 血浆 IL-1 β 、IL-18 与 mean-IMT 呈正相关 ($P<0.05$)。CEA 组血浆 IL-1 β 、IL-18 与 max-IMT 呈正相关 ($P<0.05$)。见表 4。

3 讨论

研究显示 NLRP3 炎性小体激活 Caspase-1, 促进下游免疫细胞活化, 大量的炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 成熟和分泌^[9]。IL-1 β 和 IL-18 已被广泛证明在动脉粥样硬化的形成中起到重要作用。曾有学者发现, IL-1 β 和 IL-18 缺失的小鼠动脉粥样硬化受到明显的抑制, 推断 NLRP3 炎性小体可能在动脉粥样硬化发生发展中起重要作用^[10-11]。Rajamaki 等^[12]发现人巨噬细胞能够摄取吞噬胆固醇结晶, 诱导人单核细胞和巨噬细胞剂量依赖性释放 IL-1 β 和 IL-18; 通过 NLRP3 siRNA 处理人巨噬细胞后降低了胆固醇结晶诱导 IL-1 β 分泌, 证实 NLRP3 炎性小体介导了人巨噬细胞中胆固醇结晶的作用。Duewell 等^[13]向 LDLR-/- 小鼠移植入 NLRP3、ASC 基因敲除小鼠的骨髓后予高脂饮食, 其动脉硬化程度及炎症反应有明显减轻。本课题组王莉莉等^[14]发现氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导人单核细胞和人脐静脉内皮细胞 NLRP3 炎性小体的表达随浓度增加呈剂量依赖性升高; 通过 NLRP3 siRNA 下调其表达后, 能够明显抑制 NLRP3 炎性小体活化及其下游炎性因子的表达。彭旷等^[15]发现冠心病患者外周血单核细胞上 P2X7R、NLRP3 炎性小体 mRNA 表达高于正常人。上述研究均提示 NLRP3 炎性小体可能与动脉粥样硬化的发生发展有关。

表 2 对照组与 CEA 组一般资料									
Table 2 General data of control group and CEA group									
组别	男:女/例	年龄/岁	吸烟/%	饮酒/%	高血压病史/%	糖尿病病史/%	TIA 史/%	脑梗塞病史/%	抗凝药治疗史/%
对照组	12 : 8	62.85 $\pm$ 8.91	20	10	20	15	0	0	0
CEA 组	25 : 5	66.53 $\pm$ 6.57	43.3	20	80 ¹⁾	50 ¹⁾	16.1	30 ¹⁾	20
组别	他汀类药物 治疗史/%	胰岛素治 疗史/%	WBC /($\times 10^9$ $\cdot L^{-1}$)	单核细胞 /($\times 10^9$ $\cdot L^{-1}$)	血尿素氮 /(mmol $\cdot L^{-1}$)	血肌酐 /(μ mol $\cdot L^{-1}$)	UA /(μ mol $\cdot L^{-1}$)	TG /(mmol $\cdot L^{-1}$)	TC /(mmol $\cdot L^{-1}$)
对照组	0	0	6.06 $\pm$ 1.06	0.45 $\pm$ 0.14	6.01 $\pm$ 2.61	78.45 $\pm$ 10.39	283.79 $\pm$ 80.17	1.40 $\pm$ 0.33	4.26 $\pm$ 1.30
CEA 组	20	16.7	6.56 $\pm$ 1.23	0.46 $\pm$ 0.14	5.82 $\pm$ 1.53	76.33 $\pm$ 9.63	342.27 $\pm$ 80.21 ¹⁾	2.67 $\pm$ 0.65 ¹⁾	4.49 $\pm$ 0.79
组别	HDL-C /(mmol $\cdot L^{-1}$)	LDL-C /(mmol $\cdot L^{-1}$)	Apo-A1 /(g $\cdot L^{-1}$)	Apo-B /(g $\cdot L^{-1}$)	LDL-C /HDL-C	TC /HDL-C	TG /HDL-C	Apo-B /Apo-A1	non-HDL-C /(mmol $\cdot L^{-1}$)
对照组	1.13 $\pm$ 0.25	2.52 $\pm$ 1.09	1.22 $\pm$ 0.18	0.83 $\pm$ 0.12	2.36 $\pm$ 1.17	3.95 $\pm$ 1.50	1.32 $\pm$ 0.50	0.64 $\pm$ 0.11	3.13 $\pm$ 1.30
CEA 组	0.89 $\pm$ 0.23 ¹⁾	2.75 $\pm$ 0.64	1.29 $\pm$ 0.13	0.88 $\pm$ 0.20 ¹⁾	3.26 $\pm$ 1.07 ¹⁾	5.32 $\pm$ 1.59 ¹⁾	3.19 $\pm$ 1.31 ¹⁾	0.72 $\pm$ 0.17	3.60 $\pm$ 0.85

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

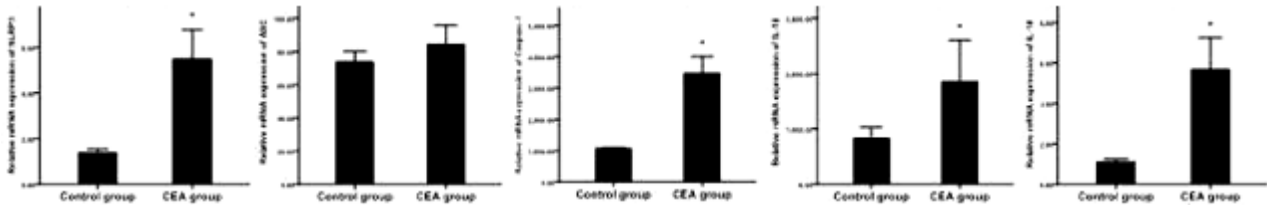
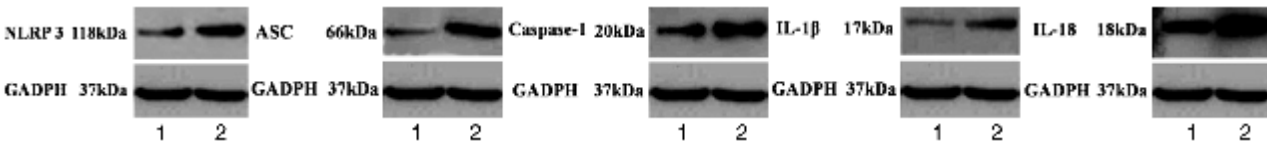


图 1 外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体各组分、IL-1β、IL-18mRNA 表达
Figure 1 Expression of NLRP3 inflammasome and IL-1β、IL-18 mRNA



1 为对照组,2 为 CEA 组。
图 3 外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体各组分、IL-1β、IL-18 蛋白表达
Figure 3 Expression of NLRP3 inflammasome and IL-1β、IL-18 protein

表 4 相关性分析结果

Table 4 Spearman's correlation analysis

项目	mean-IMT		max-IMT	
	r	P	r	P
NLRP3 mRNA	0.380	0.038	0.139	0.464
ASC mRNA	0.247	0.083	0.173	0.228
Caspase-1 mRNA	0.381	0.038	0.164	0.388
IL-1β mRNA	0.270	0.149	0.03	0.875
IL-18 mRNA	0.131	0.491	0.067	0.726
plasma IL-1β	0.432	0.017	0.419	0.021
plasma IL-18	0.441	0.015	0.382	0.037

本研究对重度颈动脉粥样硬化患者与对照组外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体 mRNA 表达进行分析,发现 CEA 组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 及血浆 IL-1β、IL-18 水平平均高于对照组。同时,在外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体蛋白质表达实验中 NLRP3 炎性小体各组分,CEA 组明显高于对照组,说明 NLRP3 炎性小体可能参与了颈动脉粥样硬化的发生发展。本研究中 CEA 组 ASC mRNA 表达未明显高于对照组,可能因为 ASC 在 NLRP3 炎性小体中主要起连接作用,而且 ASC 在 NF-κB 信号通路具有双向调节特性,ASC 与 NLRP3 的结合物能够导致 NF-κB 的活化,当仅有 ASC 时,通过抑制细胞内 IκB 激酶(IKK)的磷酸化而抑制 NF-κB 的活化,以此相互调节,从而影响 ASC 的表达^[16]。

NLRP3 作为一种模式识别受体能够识别机体某些内源性危险因素,如胆固醇结晶、尿酸盐结晶、硅颗粒、胰岛淀粉样多肽等,从而激活 NLRP3 炎性小体,启动细胞内炎性递质的释放,在非感染情况下引发和维持慢性炎症反应^[17]。本研究通过多元线性逐步回归分析发现,激活 NLRP3 炎性小体

各个成分的危险因素不尽相同,但是高血压、LDL-C、TG、UA 是 NLRP3 炎性小体多个成分的独立危险因素。LDL-C 诱发形成胆固醇结晶及尿酸盐析出形成尿酸盐结晶激活 NLRP3 炎性小体,可能是促进动脉粥样硬化形成的关键因素。文献报道 LDL-C 沉积于动脉壁内层,当其被氧化后促使单核细胞聚集、胆固醇结晶形成,进入细胞后,促使溶酶体破裂释放 ROS 以及蛋白水解酶释放,活化 NLRP3 炎性小体,促进动脉粥样硬化发生和发展^[18]。尿酸盐被单核细胞及巨噬细胞识别和摄取后通过促进钾离子外流和诱导线粒体产生大量活性氧(ROS),使 NLRP3 炎性体活化,启动炎症反应,从而促进动脉粥样硬化形成^[19]。TG 水平升高可使 TC 转运蛋白活性增加,生成富含胆固醇酯的残粒,以及含 TG 较多的 LDL,后者易于氧化形成 ox-LDL,从而激活 NLRP3 炎性小体,促进动脉粥样硬化的形成^[20]。在这些过程中高血压起到了重要作用,高血压时血液对血管壁的压力升高,导致动脉壁内皮细胞的损伤,是动脉粥样硬化的重要始动因素。本研究结论与文献报道结果一致。虽然高血压、LDL-C、UA、TG 是 NLRP3 炎性小体中多个成分激活的危险因素,但 NLRP3 炎性小体中各个成分激活的危险因素并不相同,说明在 NLRP3 炎性小体组装时仍受不同危险因素的影响。NLRP3、IL-1βmRNA 和血浆 IL-18,主要受到 LDL-C 和 HDL-C 的共同影响,当 LDL-C/HDL-C 的比值升高时,其活化增强。由于 ASC 主要起呈递作用,并不受血脂及血 UA 等的影响,而单核细胞的数量则是 ASC 的独立危险因素。颈部血管彩超是评估颈部血管病变最常用的方法。IMT 能够较准确地反映颈动脉粥样硬化的严重程度,mean-IMT 反映双侧颈动脉粥样硬化受累情况,max-IMT 反映动脉

管腔受累程度。本研究通过相关性分析发现,观察组外周血单核细胞 NLRP3、Caspase-1 mRNA,以及血浆 IL-1 β 、IL-18 水平与 mean-IMT 呈正相关,血浆 IL-1 β 、IL-18 水平与 max-IMT 呈正相关,提示 NLRP3 炎性小体及其下游炎性因子与颈动脉粥样硬化的严重程度相关。从中不难发现,血浆中的 IL-1 β 和 IL-18 水平不仅能够反应双侧颈动脉粥样硬化的受累情况,而且能够反映动脉管腔的最大受累程度。而外周血单核细胞 NLRP3 及 Caspase-1 则主要反映动脉粥样硬化受累的总体情况,并不能反映管腔最大受累程度,我们猜想斑块内单核细胞 NLRP3 炎性小体可能反映管腔动脉粥样硬化的最大受累情况,但尚需验证。本研究首次对重度颈动脉粥样硬化患者外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体表达进行观察,发现 NLRP3 炎性小体活化,并与动脉粥样硬化的程度有一定关系。而高血压、LDL-C、TG、UA 是激活 NLRP3 炎性小体表达的重要危险因素。进一步阻断 NLRP3 炎性小体,加强对 LDL-C、TG、UA 及血压水平的控制,可能对动脉粥样硬化发展起到抑制作用。但本研究主要针对外周血单核细胞 NLRP3,并未对斑块内的 NLRP3 炎性小体进行检测;且研究例数较少,没有对轻度、中度颈动脉粥样硬化患者进行检测,有待进一步研究。

参考文献

- [1] GARG N J. Inflammasomes in cardiovascular diseases [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2011, 1: 244—254.
- [2] ZHENG F, XING S, GONG Z, et al. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis [J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22: 746—750.
- [3] WANG L, QU P, ZHAO J, et al. NLRP3 and downstream cytokine expression elevated in the monocytes of patients with coronary artery disease [J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10: 791—800.
- [4] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 颅外段颈动脉狭窄治疗指南 [J]. *中国实用外科杂志*, 2008, 28(11): 913—915.
- [5] European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST) [J]. *Lancet*, 1998, 351: 1379—1387.
- [6] MORITO N, INOUE Y, URATA M, et al. Increased carotid artery plaque score is an independent predictor of the presence and severity of coronary artery disease [J]. *J Cardiol*, 2008, 51: 25—32.
- [7] CHEUK B L, CHENG S W. Annexin A1 expression in atherosclerotic carotid plaques and its relationship with plaque characteristics [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2011, 41: 364—371.
- [8] LIU H, LI W, CHEN Z, et al. Expression of the NLRP3 inflammasome in cerebral cortex after traumatic brain injury in a rat model [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38: 2072—2083.
- [9] HOFFMAN H M, BRYDGES S D. Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 10889—10896.
- [10] KIRII H, NIWA T, YAMADA Y, et al. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 656—660.
- [11] ELHAGE J, RUDLING M. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59: 234—240.
- [12] RAJAMAKI K, LAPPALAINEN J, OORNI K, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation [J]. *Plos One*, 2010, 5: e11765. doi: 10.1371/journal.pone.0011765.
- [13] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. *Nature*, 2010, 464: 1357—1361.
- [14] WANG L, QU P. Role of NLRP3 inflammasome and downstream cytokines in atherosclerosis [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2013.
- [15] PENG K, LIU L, QU P, et al. P₂X₇R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35: 1179—1188.
- [16] STEHLIK C, FIORENTINO L, DORFLEUTNER A, et al. The PAAD/PYRIN-family protein ASC is a dual regulator of a conserved step in nuclear factor kappa B activation pathways [J]. *J Exp Med*, 2002, 196: 1605—1615.
- [17] CASSEL S L, JOLY S, SUTTERWALA F S, et al. The NLRP3 inflammasome: a sensor of immune danger signals [J]. *Semin Immunol*, 2009, 21: 194—198.
- [18] ABELA G S, AZIZ K, VEDRE A, et al. Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103: 959—968.
- [19] LIPPI G, MONTAGNANA M, FRANCHINI M, et al. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 392: 1—7.
- [20] HOKANSON J E. Hypertriglyceridemia and risk of coronary heart disease [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2002, 4: 488—493.

(收稿日期: 2015-05-06 修回日期: 2015-09-08)