类风湿性关节炎患者外周血 Nod 样受体蛋白 3 炎症小体和白细胞介素 1β 表达*

陆光辉[1], 褚志华[1**], 曾守逵[1], 李春美[1], 杨洁[1], 游浩[2]
(1. 湖北民族大学附属民大医院 检验科, 湖北 恩施 445000; 2. 江汉大学第一附属医院, 湖北 武汉 430000)

[摘 要] **目的:** 探讨类风湿性关节炎(RA)患者外周血 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体和白细胞介素 1β(IL-1β)表达的变化及意义。**方法:** 选取 106 例 RA 患者作为 RA 组、40 例骨性关节炎患者作为非 RA 组、60 例健康者作为对照组,RA 与非 RA 组于入院后第 2 天清晨、对照组于体检当日清晨采集空腹静脉血检测 C 反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)、抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体及类风湿因子(RF)水平;根据疾病活动性评分(DAS28)将 RA 患者分为高、中、低活动期,比较各个活动期 RA 患者外周血单个核细胞 *NLRP*3、半胱氨酸蛋白酶 1(*Caspase*-1)和凋亡相关斑点样蛋白(*ASC*)mRNA 表达水平及血清 IL-1β 水平,采用 *Pearson* 分析 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 及血清 IL-1β 水平与其他临床指标相关性,采用多元线性回归分析 DAS28 评分影响因素。**结果:** 与非 RA 组和对照组相比,RA 组外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1、*ASC* mRNA 相对表达量及血清 IL-1β 水平均显著升高,且高度活动期 > 中活动期 > 低活动期($P < 0.05$);CRP、RF 和 *NLRP*3 mRNA 表达量为 RA 患者 DAS28 评分的影响因素。**结论:** RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 mRNA 表达量和 IL-1β 与病情严重程度有关。

[关键词] 类风湿性关节炎; 炎症小体; Nod 样受体蛋白 3; 白细胞介素 1β; 疾病活动性
[中图分类号] R593.22 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2019)06-0725-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.022

Expression of Nod-like Receptor Protein 3 Inflammasome and Interleukin 1β in Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis

LU Guanghui[1], ZHU Zhihua[1], ZENG Shoukui[1], LI Chunmei[1], YANG Jie[1], YOU Hao[2]
(*1. Department of Laboratory, Minda Hospital Affiliated to Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, Hubei, China; 2. The First Affiliated Hospital of Jianghan University, Wuhan 430000, Hubei, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the expression and significance of nod-like receptor protein 3 inflammasome and interleukin 1β (IL-1β) in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. **Methods**: 106 patients with RA were selected as RA group, 40 patients with osteoarthritis as non-RA group and 60 healthy subjects as control group. The fasting venous blood samples of RA and non-RA groups were collected on the morning of the second day after admission, and the fasting venous blood samples of the control group were collected on the morning of the day of physical examination. The samples were used to detect the C-reactive protein (CRP), ESR, anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody and rheumatoid factor (RF) level. Patients with RA were divided into high, middle and low activity stages according to disease activity score (DAS28). The expression of *NLRP*3, *Caspase*-1 and *ASC* mRNA in peripheral blood mononuclear cells and the level of serum IL-1β in patients with RA were compared. Pearson was used to analyze the correlation between *NLRP*3 and serum

*[基金项目]湖北省卫生厅科研基金项目(JX6C-25)
**通信作者 E-mail:1827214480@qq.com
网络出版时间:2019-06-22 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.022.html

IL-1β levels in peripheral blood mononuclear cells of RA patients and other clinical indexes. Multiple linear regression analysis was used to analyze the influencing factors of DAS28 score. **Results**: Compared with non-RA group and control group, the relative expression levels of NLRP3, Caspase-1 and ASC mRNA in peripheral blood mononuclear cells and the level of IL-1β of patients with RA increased significantly, and high activity period > medium activity period > low activity period ($P<0.05$). The expression of CRP, RP and *NLRP*3 mRNA were influencing factors of DAS28 score in patients with RA ($P<0.05$). **Conclusion**: The expression of *NLRP*3 mRNA and IL-1β in peripheral blood mononuclear cells of patients with RA are related to the severity of the disease.

[**Key words**] rheumatoid arthritis; inflammasome; Nod-like receptor protein 3; interleukin 1β; disease activity

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)以全身性炎症及骨膜炎为主要临床表现,血清学检查时可查出自身抗体[1]。目前,RA 病因及发生机制尚未完全清楚,有研究指出,各种炎症介质和细胞因子直接或间接参与了 RA 发生及进展过程[2]。Nod 样受体蛋白3(nod-like receptor family pyrin domain containing 3,NLRP3)炎症小体作为 NOD 样受体分子,由 NLRP3、半胱氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)和凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein,ASC)组成,在机体固有免疫应答及非感染性炎症反应中发挥重要作用[3],它能够通过调控 Caspase-1 活化而促进白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)成熟分泌;此外,IL-1β 作为一种促炎介质,在自身炎症性疾病发生及进展中起着关键性作用[4]。本研究通过分析 RA 患者外周血中 NLRP3 炎症小体和 IL-1β 表达变化,探讨其在 RA 病情评估及诊断中的意义。

1　资料与方法

1.1　资料

选取 2015 年 2 月 ~2016 年 8 月就诊的 RA 患者 106 例作为 RA 组,男 34 例、女 72 例,30 ~ 72 岁、均(60.68 ± 12.34)岁,所有患者均符合美国风湿病学学会/欧洲抗风湿病联盟(ACR/EULAR)关于 RA 诊断标准,排除心肝肾等重要脏器严重功能不全、恶性肿瘤、急慢性感染、其他自身免疫性疾病及结缔组织病、以及孕妇或哺乳期妇女。选取同期骨性关节炎患者 40 例作为非 RA 组,男 15 例、女 25 例,32 ~ 74 岁、平均(62.84 ± 11.87)岁,均符合骨性关节炎相关诊断标准,排除标准同 RA。选取健康体检者 60 例作为对照组,男 24 例、女 36 例,29 ~ 71 岁、平均(58.90 ± 8.99)岁。本研究通过医院伦理委员会批准(医院伦理委员会批号 JYK201408160328),所有研究对象均行知情同意。

1.2　方法

1.2.1　血标本采集　RA 组与非 RA 组于入院后第 2 天清晨、对照组于体检当日清晨采集空腹静脉血 10 mL,分装于 EDTA 抗凝血管和常规管内各 5 mL。利用 Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,PBS 冲洗后,保存于 −80 ℃冰箱,用于检测 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 表达;常规管内外周血离心后分离血清,保存于 −80 ℃冰箱,用于检测 IL-1β。

1.2.2　*NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 表达　采用实时荧光定量 PCR 技术检测,细胞裂解液裂解细胞,按 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明提取总 RNA,利用紫外分光光度计(UV759S,购自上海精密仪器仪表公司)检测总 RNA 纯度,A_{260}/A_{280} 为 1.80 ~ 2.20。使用实时荧光定量 PCR 仪(StepOnePlus,购自美国 ABI 公司)按逆转录试剂盒(购自美国 Promega 公司)操作步骤将总 RNA 逆转录为 cDNA,按 PCR 试剂盒(美国 Promega 公司)说明对引物扩增。*NLRP*3、*Caspase*-1、*ASC* 及 *GAPDH*(内对照)引物序列及产物大小见表 1。PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min,94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s 循环 38 次。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量。

1.2.3　血清 IL-1β 水平　采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)法检测,试剂盒购自自南京建成生物研究所,所有操作均按试剂盒说明在标准实验室完成。

1.2.4　RA 患者病情指标　记录反映 RA 患者病情的临床评估指标,包括 C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)、红细胞沉降率(erythrocyte sedimen-

表 1　*NLRP*3、*Caspase*-1、*ASC* 及 *GAPDH* 引物序列及产物大小

Tab. 1　Sequence and Product size of *NLRP*3, *Caspase*-1, *ASC* and *GAPDH* primers

基因	序列(5′-3′)	基因大小(bp)
*NLRP*3	上游 CCACTTCCCCAGAATCGAGA	221
	下游 TGGACGTGAGACAGGAGTTC	
Caspase-1	上游 CAAGTCTCAAGCTTTGCCCG	81
	下游 TAATGAGGGCAAGACGGGTG	
ASC	上游 CGCGAGGGTCACAAACGT	140
	下游 TGCTCATCCGTCAGGACCTT	
GAPDH	上游 GCTTCTTCTCGTGCAGTGCA	168
	下游 ATGACCAGCTTCCCGTTCTC	

tation rate, ESR)、抗环瓜氨酸肽(anti-cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体和类风湿因子(rheumatoid factor, RF)水平。根据文献[5]计算疾病活动性积分(disease activity score 28, DAS28),按 DAS28 评分大小将 RA 患者分为低活动期(<3.2 分)、中活动期(3.2~5.1 分)和高度活动期(≥5.1 分)[6],比较不同活动期 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量及血清 IL-1β 水平。采用 *Pearson* 相关分析 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 及血清 IL-1β 水平与其他临床指标相关性,采用多元线性回归分析 DAS28 评分影响因素。

1.3　统计学方法

数据使用 SPSS 21.0 统计软件分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析和 *LSD-t* 检验,计数资料采用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 *Pearson* 相关分析,DAS28 评分影响因素分析采用多元线性回归分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　一般资料

3 组研究对象的年龄和性别比较差异无统计学意义($P>0.05$);RA 组患者的 CRP、ESR、CCP 和 RF 均高于非 RA 组和对照组,非 RA 组患者 CRP 和 ESR 高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2　各组研究对象一般资料比较

Tab. 2　Comparison of general information of subjects in each group

组别	*n*	年龄(岁)	性别(男/女)	CRP(mg/L)	ESR(mm/h)	CCP(RU/mL)	RF(IU/mL)
RA 患者	106	60.68±12.34	34/72	18.24±5.05(1)(2)	34.84±9.34(1)(2)	336.96±104.29(1)(2)	48.53±12.07(1)(2)
非 RA 组	40	62.84±11.87	15/25	7.76±0.97(1)	19.52±5.64(1)	39.71±8.79	5.60±0.85
对照组	60	58.90±8.99	24/36	2.21±0.20	12.12±2.12	33.21±8.63	5.44±0.83
F/χ^2		1.449	1.144	394.221	203.838	412.217	629.936
P		0.237	0.564	0.000	0.000	0.000	0.000

(1) 与对照组比较, $P<0.05$; (2) 与非 RA 组比较, $P<0.05$

2.2　外周血 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量及血清 IL-1β 水平

RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平高于非 RA 组和对照组,非 RA 组高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 3　各组外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 表达量和血清 IL-1β 水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3　The expressions of *NLRP*3, *Caspase*-1 and *ASC* mRNA and serum levels of IL-1β in peripheral blood mononuclear cells in each group

组别	*n*	mRNA 相对表达量			IL-1β(ng/L)
		*NLRP*3	*Caspase*-1	*ASC*	
RA 组	106	2.05±0.29(1)(2)	1.84±0.17(1)(2)	1.72±0.24(1)(2)	10.31±2.07(1)(2)
非 RA 组	40	1.54±0.12(1)	1.47±0.12(1)	1.30±0.09(1)	6.11±1.13(1)
对照组	60	1.04±0.07	1.05±0.04	1.02±0.05	2.14±0.80
F		426.982	645.750	302.157	493.982
P		0.000	0.000	0.000	0.000

(1) 与对照组比较, $P<0.05$; (2) 与非 RA 组比较, $P<0.05$

2.3 不同分期 RA 患者外周血单个核细胞中 NLRP3、Caspase-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平

高度活动期 RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平均高于中活动期和低活动期，中活动期又高于低活动期，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表 4。

表 4　不同分期 RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平（$\bar{x}\pm s$）

Tab. 4　The expressions of *NLRP*3, *Caspase*-1 and *ASC* mRNA and serum levels of IL-1β in peripheral blood mononuclear cells of RA patients at different stages

组别	*n*	mRNA 相对表达量			IL-1β（ng/L）
		*NLRP*3	*Caspase*-1	*ASC*	
高度活动期	28	2.43 ± 0.10[(1)(2)]	2.05 ± 0.14[(1)(2)]	2.00 ± 0.12[(1)(2)]	12.32 ± 1.53[(1)(2)]
中活动期	37	2.09 ± 0.13[(1)]	1.81 ± 0.08[(1)]	1.79 ± 0.10[(1)]	10.95 ± 1.42[(1)]
低活动期	41	1.76 ± 0.08	1.71 ± 0.07	1.47 ± 0.10	8.37 ± 0.86
F		361.249	105.773	223.079	87.805
P		0.000	0.000	0.000	0.000

[(1)] 与对照组比较，$P<0.05$；[(2)] 与非 RA 组比较，$P<0.05$

2.4 RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 表达和血清 IL-1β 水平与其他临床指标的相关性

相关分析显示，RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 表达量和血清 IL-1β 水平均与 *Caspase*-1 mRNA、*ASC* mRNA、CRP、ESR、RF 和 DAS28 评分呈正相关（$P<0.05$），见表 5。

表 5　RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 表达和血清 IL-1β 水平与其他临床指标相关性（r，$n=106$）

Tab. 5　Correlation between the expression of *NLRP*3 and serum level of IL-1β in peripheral blood mononuclear cells of RA patients and other clinical indicators

指标	*NLRP*3	*Caspase*-1	*ASC*	IL-1β	CRP	ESR	CCP	RF	DAS28 评分
*NLRP*3		0.719 2[(1)]	0.823 4[(1)]	0.731 7[(1)]	0.870 2[(1)]	0.660 3[(1)]	0.611 2[(1)]	0.818 8[(1)]	0.874 4[(1)]
IL-1β	0.732 1[(1)]	0.627 8[(1)]	0.794 2[(1)]		0.668 6[(1)]	0.525 1[(1)]	0.530 3[(1)]	0.627 6[(1)]	0.707 6[(1)]

注：[(1)] $P<0.05$

2.5 RA 组患者 DAS28 评分影响因素分析

以 DAS28 评分为因变量，以 RA 组患者的年龄、CRP、ESR、CCP、RF、*NLRP*3 Mrna 相对表达量、*Caspase*-1 mRNA 相对表达量、*ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平为自变量进行多元线性回归分析，结果显示，RA 组患者的 CRP、RF 和 *NLRP*3 mRNA 表达量是其 DAS28 评分的影响因素（$P<0.05$），见表 6。

表 6　RA 组患者 DAS28 评分影响因素的多元线性回归分析

Tab. 6　Multiple linear regression analyze on influencing factors of DAS28 score of RA patients

指标	*B*	*SE*	*β*	*t*	*P*
CRP	0.133	0.040	0.298	3.303	0.001
RF	0.045	0.014	0.240	3.287	0.001
*NLRP*3 mRNA	1.711	0.760	0.218	2.252	0.027

3　讨论

RA 作为女性高发的一种自身免疫性疾病，可破坏关节及周围组织，损伤关节功能，具有较高的致残率，若早期未进行规范化治疗，3 年内 70 % 左右的患者会出现关节受损[7]，严重影响了患者生活质量。既往研究发现，免疫炎症反应在 RA 发病过程中起着关键性作用，细胞因子参与及介导了 RA 滑膜病变过程[8-9]。NLRP3 炎症小体是炎症反应的核心，与多种疾病发生及进展密切相关[10]，NLRP3、Caspase-1 和 ASC 是 NLRP3 炎症小体主要组成成分，NLRP3 主要存在于单核巨噬细胞、嗜中性粒细胞及一些初级免疫细胞的细胞质和细胞膜中[11-12]。正常情况下，NLRP3 炎症小体以非活性状态存在于机体，一旦受到病原微生物或机体内危险信号刺激时迅速活化，通过调控 Caspase-1 活性

对 IL-1β 等炎症因子前体进行切割,促使其成熟并释放至胞外,从而引发炎症级联反应[13-14]。本研究结果显示,RA 组外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平均高于非 RA 组和对照组,提示 NLRP3 炎症小体介导的炎症反应可能参与了 RA 发病过程。

CRP 和 ESR 是反映自身免疫性疾病活动性重要指标,CCP 和 RF 则是 RA 主要临床诊断指标[15]。本研究结果显示,RA 组 CRP、ESR、CCP 和 RF 高于非 RA 组和对照组,相关分析显示 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 表达量和血清 IL-1β 水平均与 *Caspase*-1、ASC、CRP、ESR 和 RF 呈正相关,提示 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 mRNA 表达量和血清 IL-1β 水平与患者活动性有关,提示这两个指标有望成为 RA 诊断指标。DAS28 作为评价 RA 病情的重要指标,评分越高则病情越严重[16]。本研究结果显示,高度活动期 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3、*Caspase*-1 和 *ASC* mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平均高于中活动期和低活动期,中活动期高于低活动期,说明 NLRP3 炎症小体通路介导的炎症反应与 RA 病情密切相关,参与了患者病情进展过程。此外,RA 组患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 mRNA 相对表达量和血清 IL-1β 水平均与 DAS28 评分呈正相关,*NLRP*3 mRNA 表达量是 DAS28 评分的影响因素之一,提示 RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 mRNA 表达量和血清 IL-1β 水平可作为评估患者病情的指标。

综上所述,RA 患者外周血单个核细胞中 *NLRP*3 mRNA 表达量和血清 IL-1β 水平升高,且与患者病情严重程度有关,提示 NLRP3 炎症小体通路介导的炎症反应参与了 RA 发生进展过程,有望为 RA 诊断及病情评估提供新的指标。

4　参考文献

[1] GEROSA M, SCHIOPPO T, MERONI P L. Challenges and treatment options for rheumatoid arthritis during pregnancy[J]. Expert Opin Pharmacother, 2016, 17(11): 1539-1547.

[2] ALAM J, JANTAN I, BUKHARI S N A. Rheumatoid arthritis: recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92(8): 615-633.

[3] 何岱昆,邵义如,申捷,等. NLRP3 炎症小体参与光气致急性肺损伤的炎症反应[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2017, 35(7): 491-496.

[4] HOSEINI Z, SEPAHVAND F, RASHIDI B, et al. NLRP3 inflammasome: its regulation and involvement in atherosclerosis[J]. J Cell Physiology, 2018, 233(3): 2116-2132.

[5] 潘美娟,徐胜前,王欣荣,等. 血清成纤维生长因子 23 水平在类风湿关节炎及其骨质疏松中的临床研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2018, 22(9): 597-602.

[6] 徐月辰,徐胜前,何秋时,等. 体重指数和体脂百分比与类风湿关节炎的相关性研究[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(1): 46-49.

[7] TEITSMA X M, JACOBS J W G, WELSING P M J, et al. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis patients: comparing tocilizumab- and methotrexate-based treat-to-target strategies[J]. Rheumatology, 2018, 57(2): 309-317.

[8] 张晓园,王永辉,李艳彦,等. JAK-STAT 信号转导通路在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2016, 17(2): 63-65.

[9] ZHU L, ZHU L. Sophocarpine suppress inflammatory response in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis[J]. Eur Cytokine Netw, 2017, 28(3): 120-126.

[10] MCALLISTER M J, CHEMALY M, EAKIN A J, et al. NLRP3 as a potentially novel biomarker for the management of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2018, 26(5): 612-619.

[11] 何岱昆,邵义如,申捷,等. NLRP3 炎症小体参与光气致急性肺损伤的炎症反应[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2017, 35(7): 491-496.

[12] TANG T, GONG T, JIANG W, et al. GPCRs in NLRP3 inflammasome activation, regulation, and therapeutics[J]. Trends Pharmacol Sci, 2018, 39(9): 798-811.

[13] GONG T, YANG Y, JIN T, et al. Orchestration of NLRP3 inflammasome activation by ion fluxes[J]. Trends Immunol, 2018, 39(5): 393-406.

[14] MANGAN M S J, OLHAVA E J, ROUSH W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606.

[15] CAI X H, YANG S P, SHEN H L, et al. Application of contrast-enhanced ultrasonography and ultrasonography scores in rheumatoid arthritis[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20056-20064.

[16] 王玉辉. 类风湿性关节炎患者血清 Th17/Treg 细胞变化特征[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2018, 19(1): 53-55.

(2019-03-18 收稿,2019-05-31 修回)

中文编辑:严　征;英文编辑:雷　妍