

T2DM 患者外周血单个核细胞中 NLRP3-mRNA 表达与并发颈动脉粥样硬化的相关性研究

谢海龙 李俊立 万靖 李承彬

基金项目:荆州市科技局资助项目(2012041)

作者单位:434020 荆州市,长江大学研究生院医学院(谢海龙)

434020 荆州市,荆州市中心医院检验科(李俊立 万靖 李承彬)

通讯作者:李承彬, E-mail: jzlc001@163.com

【摘要】 目的 研究炎性小体中含热蛋白结构域 3 的 NOD 样受体(NLR family, pyrin domain containing 3, NLRP3)在 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)合并颈动脉粥样硬化(carotid artery atherosclerosis, CAS)患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中的表达水平及其与疾病发生和发展的相关性。**方法** 收集 2013 年 6 月至 12 月期间于我院就诊的 T2DM 患者 107 例、单纯 CAS 患者 35 例和健康体检者 35 例;其中 T2DM 患者根据 CAS 斑块情况分为单纯 T2DM 组 26 例、T2DM 轻度斑块组 32 例、T2DM 中度斑块组 38 例、T2DM 重度斑块组 11 例。采用实时荧光定量聚合酶链反应技术检测各组患者 PBMCs 中 NLRP3-mRNA 的表达水平,并对检测结果进行统计学分析。**结果** 正常对照组、单纯 T2DM 组、T2DM 合并 CAS 组、单纯 CAS 组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.01$)。单纯 T2DM 组、T2DM 合并 CAS 组、单纯 CAS 组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量均高于正常对照组,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);T2DM 合并 CAS 组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量高于单纯 T2DM 组和单纯 CAS 组,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。在 T2DM 合并 CAS 各组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量差异有统计学意义($P < 0.01$)。T2DM 中度和重度斑块组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量均低于 T2DM 轻度斑块组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。T2DM 合并 CAS 组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量与斑块成熟程度呈负相关($r = -0.70$, $P < 0.01$)。**结论** NLRP3-mRNA 与 T2DM 合并 CAS 的发生和发展密切相关。

【关键词】 NLRP3;外周血单个核细胞;颈动脉粥样硬化;2 型糖尿病;实时荧光定量 PCR

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.004

The correlation research between the expression of NLRP3-mRNA in patients with type 2 diabetes mellitus and carotid artery atherosclerosis

XIE Hai-long¹, LI Jun-li², WAN Jing², et al. ¹Medical College, the Graduate School of Changjiang University, Jingzhou 434020, China ²Department of Clinical Laboratory, the Center Hospital of Jingzhou, Jingzhou 434020, China

【Abstract】 Objective To study the correlation between the expression of NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and carotid artery atherosclerosis (CAS). **Methods** 107 cases patients with T2DM, 35 cases patients with CAS and 35 cases healthy controls from June 2013 to December 2013 in our hospital were collected. The T2DM patients were divided into T2DM group (26 cases), T2DM combine mild plaque group (32 cases), T2DM combine midrange plaque group (38 cases), and T2DM combine severe plaque group (11 cases). The expression levels of NLRP3-mRNA in PBMCs in all the groups were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, and the results were analyzed statistically. **Results** There was statistical significance in the difference of NLRP3-mRNA expression level among control group, T2DM group, T2DM combine CAS group and CAS group ($P < 0.01$). The NLRP3-mRNA expression levels in T2DM group, T2DM combine CAS group and CAS group were all higher than that of control group, and the differences all had statistical significance (P all < 0.05). The NLRP3-mRNA expression level in T2DM combine CAS group was higher than that of T2DM group and CAS group, and the differences all had statistical significance (P all < 0.05). There was statistical significance in the difference of NLRP3-mRNA expression level among all the T2DM combine CAS groups ($P < 0.01$). The NLRP3-mRNA expression levels in T2DM combine severe plaque

group and T2DM combine midrange plaque group were all lower than that of T2DM combine mild plaque, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). The correlation research results showed that the NLRP3-mRNA expression level was negative correlated with plaque maturation degree ($r = -0.70$, $P < 0.01$).

Conclusion The NLRP3-mRNA is correlated with the occurrence and development of T2DM combine CAS.

【Key words】 NLRP3; Peripheral blood mononuclear cells; Carotid artery atherosclerosis; Type 2 diabetes mellitus; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

炎性小体中含热蛋白结构域 3 的 NOD 样受体 (NLR family, pyrin domain containing 3, NLRP3) 是 NLR 家族的一员,也是研究最为广泛的基因之一^[1]。NLRP3 可被多种刺激物质激活,如胆固醇晶体、活性氧等^[2]。活化后的 NLRP3 触发 NLRP3 炎性小体装配形成一个大分子复合物,控制半胱天冬酶 1 (caspase-1) 的活性,并随后产生具有生物活性的 IL-1 β ,引起无菌性炎症反应,介导炎症的发生和发展^[3]。而炎性学说是关于动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 发生发展的学说之一,也是引发 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者心血管病变的学说之一^[4,5]。本文研究通过检测 T2DM 合并颈动脉粥样硬化 (carotid artery atherosclerosis, CAS) 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中 NLRP3-mRNA 的表达水平,探讨 NLRP3 基因与 T2DM 并发 CAS 的相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2013 年 6 月至 2013 年 12 月期间于我院就诊的 T2DM 患者 107 例,根据华盛顿大学 CAS 斑块的超声分级标准将其分为无斑块的单纯 T2DM 组 ($n = 26$) 和有斑块的 T2DM 合并 CAS 组 ($n = 81$),后者又分为 I 级,单侧斑块 ≤ 2.0 mm 的 T2DM 轻度斑块组 ($n = 32$); II 级,单侧斑块 > 2.0 mm 或双侧均有斑块且其中至少一侧斑块 ≤ 2.0 mm 的 T2DM 中度斑块组 ($n = 38$); III 级,双侧斑块均 > 2.0 mm 的 T2DM 重度斑块组 ($n = 11$)。选择同期在我院就诊的无 T2DM 的 CAS 患者作为单纯 CAS 组 ($n = 35$)。另选择健康体检者作为正常对照组 ($n = 35$)。各病例组除符合诊断标准外,排除 cryopyrin 相关周期热综合征、痛风、阿尔茨海默症等炎症性疾病。各组受试者间年龄、性别经平衡性检验,差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05),具有可比性。

1.2 主要仪器与试剂 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)、GENIUS 原位 PCR 仪 (英国 Techne 公司)、Auagra 冷冻高速离心机 (贝克曼库尔特公司)、TDZ5-WS 离心机 (中国长沙湘智离心机仪器有限公司)、DW-40L188 低温保温箱 (中国青岛海

尔集团)、MINI-6K 微型离心机 (中国珠海黑马医学仪器有限公司)、UV-1700 紫外分光光度计 (岛津制作所)、PAC3000 高压电泳仪 (伯乐公司)、XW-80 漩涡混匀器 (中国上海医大仪器厂) 和 IE33 多普勒彩色超声诊断仪 (飞利浦公司)。淋巴细胞分离液由北京 Solarbio Science 公司提供,TRIzol 总 RNA 提取试剂由美国 life technologies 公司提供,HIFI-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒与 GoidStar TaqMan Mixture (with ROX) 试剂盒由北京康为世纪生物科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 参考文献^[6]的内容,在 GenBank 中搜索人类 NLRP3 基因序列和人类 β -actin 基因序列,使用 primer express v2.0 设计引物及探针,由美国 life technologies 公司合成。NLRP3 上游:5'-TGCCCGTCTGGGTGAGA-3',浓度为 10 μ M,下游:5'-CCGGTGCTCCTTGATGAGA-3',浓度为 10 μ M; 探针:5'-(FAM)TGAGCCTCAACAAACGCTACACAGACT(DAB)-3',浓度为 10 μ M。 β -actin 上游:5'-GCTGTCTGCCTTGCTAGTGGAT-3',浓度为 10 μ M,下游:5'-GCATCGTCACCACCAAAGC-3',浓度为 10 μ M; 探针:5'-(FAM)ATGGGTCAGGGATGTGCAAGGCA(DAB)-3',浓度为 10 μ M。

1.3.2 总 RNA 的提取与逆转录 每 2 ml 全血加 2 ml 生理盐水,混匀后加 2 ml 淋巴细胞分离液,取 PBMCs,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,20 μ l DEPC 水溶解,通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 鉴定 RNA 的纯度,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量,均符合要求后按试剂盒操作说明进行逆转录反应。20 μ l 反应体系包含 2.5 mM dNTP Mix Each 4 μ l,Primer Mix 2 μ l,5 $\times$ RT Buffer 4 μ l,0.1 M DTT 2 μ l,200 U/ μ l HIFI-MM-LV 1 μ l,RNase-free water 2 μ l,模板 5 μ l。反应条件:42 $^{\circ}$ C 50 min、85 $^{\circ}$ C 5min。产物-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-FQ-PCR) 检测 依据参考文献^[7]所描述的方法,优化后进行 RT-FQ-PCR 检测。20 μ l 反应体系包含 2 $\times$ Glodstar Taqman Mixture 10 μ l,上下游引物及探针各 1 μ l,逆

转录产物 5 μ l, 加入 RNase-Free water 至 20 μ l; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 10 个循环, 然后 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 15 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环。所有标本均做双份检测, 取均值统计数据, 采用双德塔法计算目的基因的相对表达量, 即以对照组表达量为参照进行计算, 公式如下 $\Delta\Delta Ct = (\text{患者目的基因 } Ct - \text{管家基因 } Ct) - (\text{对照组目的基因 } Ct - \text{管家基因 } Ct)$

患者组相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量资料的比较采用方差分析, NLRP3-mRNA 相对表达量与斑块成熟度的相关性分析采用 *Pearson* 相关性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间 NLRP3-mRNA 相对表达量检测结果比较 各组间 NLRP3-mRNA 的相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。单纯 T2DM 组、T2DM 合并 CAS 组以及单纯 CAS 组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量均高于正常对照组, 且差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05); T2DM 合并 CAS 组中 NLRP3-mRNA 相对表达量高于单纯 T2DM 组和单纯 CAS 组, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); 单纯 T2DM 组 NLRP3-mRNA 相对表达量与单纯 CAS 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组间 NLRP3-mRNA 相对表达量检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NLRP3-mRNA 相对表达量
正常对照组	35	1.00 $\pm$ 0.08
单纯 T2DM 组	26	1.70 $\pm$ 0.76* $^{\circ}$
T2DM 合并 CAS 组	81	3.35 $\pm$ 0.34*
单纯 CAS 组	35	1.31 $\pm$ 0.32* $^{\circ}$
F 值	-	403.16
P 值	-	< 0.01

注: *与正常对照组比较, $P < 0.05$; $^{\circ}$ 与 T2DM 合并 CAS 组比较, $P < 0.05$

2.2 在 T2DM 合并 CAS 各组间 NLRP3-mRNA 相对表达量检测结果比较 三组间 NLRP3-mRNA 相对表达量差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。T2DM 轻度斑块组的 NLRP3-mRNA 相对表达量高于中度和重度组, 且差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。T2DM 中度和重度斑块组间 NLRP3-mRNA 的相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 T2DM 合并 CAS 组 NLRP3-mRNA 相对表达量与斑块成熟度的相关性分析 *Pearson* 相关性分析

结果显示, T2DM 合并 CAS 患者 NLRP3-mRNA 的相对表达量随着斑块成熟度的升高而逐渐降低, 二者呈负相关关系 ($r = -0.70, P < 0.01$), 见图 1。

表 2 T2DM 合并 CAS 各组间 NLRP3-mRNA

相对表达量检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NLRP3-mRNA 相对表达量
T2DM 轻度斑块组	32	5.03 $\pm$ 1.14
T2DM 中度斑块组	38	2.74 $\pm$ 1.19*
T2DM 重度斑块组	11	2.28 $\pm$ 0.62*
F 值	-	45.53
P 值	-	$P < 0.01$

注: *与 T2DM 轻度斑块组比较, $P < 0.05$

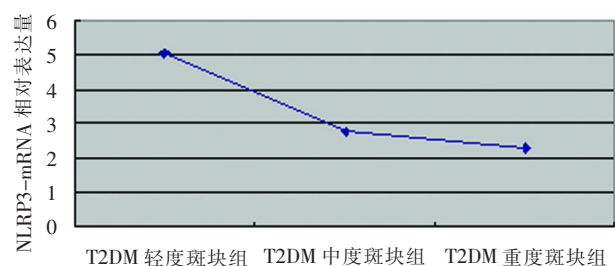


图 1 T2DM 合并 CAS 组 NLRP3-mRNA 相对表达量趋势图

3 讨论

T2DM 是最常见的内分泌代谢综合征, 在疾病的发生和发展中伴有自发的炎症反应, 且易引发多种并发症, 其中心血管疾病是最重度的并发症之一, 也是导致 T2DM 患者死亡的重要因素^[6,7]。NLRP3 炎症小体是一种多蛋白复合物, 参与 T2DM 及其并发症的发生和发展^[8]。NLRP3 可被多种物质刺激活化, 如胆固醇晶体、神经酰胺、活性氧、胰岛淀粉样多肽等。NLRP3 活化后与凋亡相关的斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 结合, 并促使 ASC 和前半胱天冬酶 1 (pro-caspase-1) 结合, 形成 NLRP3 炎症小体^[9]。炎症小体活化后, ASC 刺激 pro-caspase-1 使其裂解为有活性的 caspase-1。有活性的 caspase-1 使前白介素 pro-IL-1 β 裂解成为成熟的炎症因子 IL-1 β 并产生炎症反应, 促使 T2DM 发生 CAS 病变^[10]。

本文研究结果显示, NLRP3-mRNA 在各病例组中均高表达, 且相对表达量均显著高于正常对照组 (P 均 < 0.05), 这与 Hermansson 等^[11]的报道一致。而且 T2DM 合并 CAS 组中 NLRP3-mRNA 的相对表达量显著高于单纯 T2DM 组和单纯 CAS 组 (P 均 < 0.05), 提示 T2DM 并发 CAS 与 NLRP3-mRNA 高表达相关。具体作用机制可能是 T2DM 患者机体中 PBMCs 受到胰岛淀粉样多肽或者胆固醇晶体等的

刺激,使细胞内 NLRP3-mRNA 活化,招募 ASC 及 pro-caspase-1 形成活化的 NLRP3 炎性小体,并促使炎症因子成熟和释放,产生炎症反应。继而在炎症的持续作用下使胰岛 β 细胞和颈动脉发生病变,导致 T2DM 和 CAS 的发生发展。本文研究结果还发现,虽然单纯 T2DM 组中 NLRP3-mRNA 相对表达量高于单纯 CAS 组,但这两组的 NLRP3-mRNA 相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$),引起这一结果的原因仍不清楚,有待进一步研究。

本文研究通过对 T2DM 合并不同程度 CAS 患者 NLRP3-mRNA 相对表达量的检测结果发现,在斑块形成的不同时期,NLRP3-mRNA 的相对表达量不同,其中 T2DM 轻度斑块组表达量显著高于中度和重度斑块组,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。且 NLRP3-mRNA 的相对表达量与 CAS 斑块的成熟程度呈负相关 ($r = -0.70, P < 0.01$)。即在 CAS 斑块形成初期 NLRP3-mRNA 的相对表达量最高,随着 CAS 斑块的逐渐成熟,NLRP3-mRNA 的表达水平逐渐降低,提示 NLRP3-mRNA 高表达,即炎症增强极有可能是启动 T2DM 患者 CAS 斑块形成的重要因素;而炎症缓解或斑块成熟又可使 NLRP3-mRNA 表达下调,但其中的具体机制尚不十分明确,有待进一步研究。

综上所述,NLRP3-mRNA 高表达与 T2DM 并发 CAS 的发生、发展密切相关,检测 NLRP3-mRNA 表达量可能会成为诊断、预防和治疗 T2DM 并发 CAS 的新靶点。但连续检测 NLRP3-mRNA 表达量评估 T2DM 合并 CAS 病情的具体方法,仍有待进一步的研究。

4 参考文献

- Fullerton MD, Steinberg GR, Schertzer JD. Immunometabolism of AMPK in insulin resistance and atherosclerosis. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 366: 224-234.
- Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, et al. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2013, 62: 194-204.
- 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版). *中华糖尿病杂志*, 2014, 30: 5-8.
- Rovite V, Maurins U, Megnis K, et al. Association of F11 polymorphism rs2289252 with deep vein thrombosis and related phenotypes in population of Latvia. *Thromb Res*, 2014, 134: 659-663.
- Luo B, Wang F, Li B, et al. Association of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 inflammasome and adverse clinical outcomes in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51: 1521-1528.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42: 792-795.
- Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*, 2010, 327: 296-300.
- Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 2011, 117: 3720-3732.
- Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009, 57: 165-176.
- De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol*, 2011, 32: 373-379.
- Hermansson C, Lundqvist A, Wasslavik C, et al. Reduced expression of NLRP3 and MEFV in human ischemic heart tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430: 425-428.

(收稿日期: 2014-12-23)

(本文编辑: 杨军)

消 息

致谢

《实用检验医师杂志》编辑部全体工作人员衷心感谢以下编委/专家对本刊出版的大力支持! (姓名以拼音为序)

陈 涛	陈 葳	陈 伟	郭微媛	胡成进	胡晓波	焦连亭
孔鹏洲	李会强	李健开	穆 红	任建平	沈 霞	孙 忠
覃 西	唐爱国	魏殿军	伍严安	肖创清	张贺平	张会英
张军力	张 曼	张 鹏	张时民	赵克斌	郑 磊	