

NLRP3 炎症复合体与原发青光眼视神经损伤程度相关性

牟琳, 李来, 李妍

引用: 牟琳, 李来, 李妍. NLRP3 炎症复合体与原发青光眼视神经损伤程度相关性. 国际眼科杂志 2019;19(7):1123-1125

作者单位: (646000) 中国四川省泸州市, 西南医科大学附属中医医院眼科

作者简介: 牟琳, 毕业于中南大学, 硕士, 主任医师, 科主任, 研究方向: 晶状体及相关疾病。

通讯作者: 李妍, 毕业于成都中医药大学, 硕士, 副主任医师, 科室副主任, 研究方向: 晶状体及相关疾病. 73128779@qq.com

收稿日期: 2019-01-11 修回日期: 2019-06-11

摘要

目的: 探讨 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症复合体与原发开角型青光眼 (POAG) 视神经损伤程度的相关性。

方法: 选取 2016-05/2017-05 我院收治并确诊的 POAG 患者 65 例 98 眼, 纳入同期 30 例 49 眼白内障患者为对照组。根据视野平均缺损 (MD) 分为轻 (A 组)、中 (B 组) 及重度损伤 (C 组) 3 组。ELISA 检测血清 IL-1 β 、IL-18 浓度; 流式细胞仪检测血液中 NLRP3、凋亡相关微粒蛋白 (ASC)、胱冬肽酶-1 (Caspase-1) 阳性巨噬细胞比例。

结果: POAG 组 IL-1 β 、IL-18 浓度及 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性细胞比例均高于对照组 ($P < 0.05$)。C 组 IL-1 β 、IL-18 浓度及 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性细胞比例均显著高于 A、B 组 ($P < 0.05$)。POAG 患者血清中 IL-1 β 、IL-18 浓度与视野损伤程度呈正相关 ($r = 0.432, 0.765$); NLRP3、ASC、Caspase-1 的阳性细胞比例与视野损伤程度呈正相关 ($r = 0.517, 0.481, 0.340$)。

结论: 血清 IL-1 β 、IL-18 浓度及 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性巨噬细胞比例与 POAG 患者视神经损伤程度呈正相关。

关键词: 原发性开角型青光眼; 视神经损伤; NLRP3; IL-1 β ; IL-18

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.7.08

Correlation between NLRP3 inflammation complex and the degree of optic nerve injury in primary glaucoma

Lin Mu, Lai Li, Yan Li

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yan Li. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest

Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 73128779@qq.com

Received:2019-01-11 Accepted:2019-06-11

Abstract

• **AIM:** To investigate the correlation between NLRP3 inflammation and optic nerve injury in primary open-angle glaucoma (POAG).

• **METHODS:** Totally 65 POAG patients (98 eyes) in our hospital from May 2016 to May 2017 were selected, meanwhile 30 cataract patients (49 eyes) were as control group. Visual impairment was judged according to the mean defect value (MD) and divided into mild (group A), moderate (group B) and severe (group C) groups. The quality of IL-1 β and IL-18 in plasma was detected by ELISA, and proportion of NLRP3, ASC and Caspase-1 positive macrophages was measured by flow cytometry.

• **RESULTS:** The levels of IL-1 β and IL-18 and the proportion of NLRP3, ASC and Caspase-1 positive cells in POAG group were obviously higher than those in control group ($P < 0.05$). The levels of IL-1 β and IL-18 and the proportion of NLRP3, ASC and Caspase-1 positive cells in group C were highest in subgroups ($P < 0.05$). The serum levels of IL-1 β and IL-18 in POAG patients were positively correlated with visual field injury ($r = 0.432, 0.765$), and the proportion of positive cells of NLRP3, ASC and Caspase-1 was positively correlated with visual field injury ($r = 0.517, 0.481, 0.340$).

• **CONCLUSION:** Serum levels of IL-1 β , IL-18 and the proportion of NLRP3, ASC and Caspase-1 positive macrophages are positively correlated with the degree of optic nerve injury in POAG patients.

• **KEYWORDS:** primary open-angle glaucoma; optic nerve injury; NLRP3; IL-1 β ; IL-18

Citation: Mu L, Li L, Li Y. Correlation between NLRP3 inflammation complex and the degree of optic nerve injury in primary glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(7):1123-1125

0 引言

原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 是最常见青光眼类型, 约占青光眼 60% ~ 70%, 对患者的视觉功能造成严重影响, 常显著降低患者生活质量。POAG 的病理特征是慢性进行性前部视神经病变, 热休克蛋白抗体升高为其特征之一, 故有研究认为免疫因素在青光眼发生、发展中发挥重要作用, 进而推测血清细胞因子所参与的免疫反应在青光眼进程中具有重要作用, 且

表1 两组患者 IL-1 β 、IL-18 浓度和 NLRP3 炎症复合体的变化

组别	例数	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)	NLRP3 (%)	ASC (%)	Caspase-1 (%)
POAG 组	65	45.87 \pm 6.20	116.53 \pm 11.84	45.67 \pm 9.33	34.98 \pm 9.02	42.74 \pm 8.25
对照组	30	19.05 \pm 8.13	95.43 \pm 15.92	36.32 \pm 8.96	28.15 \pm 9.17	38.08 \pm 6.51
<i>t</i>		17.712	7.216	4.596	3.413	3.122
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.002

注:对照组:白内障患者。

可能对疾病具有预测作用^[1-2]。因此,本研究对 POAG 患者不同视神经损伤阶段的血液巨噬细胞 NOD 样受体蛋白 3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症复合体的表达进行检测与比较,旨在进一步探究免疫反应在 POAG 中的作用,为临床 POAG 诊疗提供理论参考。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2016-05/2017-05 我院收治并确诊的 POAG 患者 65 例 98 眼,其中男 35 例 51 眼,女 30 例 47 眼,年龄 45~70(54.15 \pm 6.32)岁;正常眼压性 15 例 22 眼,慢性单纯性 50 例 76 眼。同时纳入同期于本院诊治的 30 例 49 眼白内障患者设为对照组,其中男 13 例 23 眼,女 17 例 26 眼,年龄 43~72(53.27 \pm 6.74)岁。两组患者的年龄、性别比例等资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。由经验较丰富的医师采用一体化全自动电脑视野仪对观察组 65 例 98 眼 POAG 患者的视野平均缺损(mean defect, MD)程度进行检测,根据 MD 值将观察组分为轻度损伤组(A组)35 例、中度损伤组(B组)16 例及重度损伤组(C组)14 例,MD 值分别为 ≤ 6 dB、7~12dB、 > 12 dB。三组患者的年龄、性别、眼压等资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。纳入标准:(1)结合患者资料,经两位主治及以上医师依据 2008 年专家共识诊断为 POAG^[3];(2)有可供检测的血浆标本。排除标准:(1)既往眼部手术史,或有接受放疗、化疗和生物细胞免疫治疗病史的患者;(2)存在意识或精神障碍,不能配合的患者;(3)合并严重心、肝、肾等其他器官功能障碍或全身免疫性疾病患者;(4)合并血液性、感染性、免疫性疾病或其他恶性肿瘤疾病的患者。患者和家属对研究内容知情,自愿参与并签署知情同意书,研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 血清 IL-1 β 、IL-18 水平检测

对两组患者的白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-18 血清细胞因子浓度进行检测。具体检测方法:抽取 5mL 外周静脉血液标本,高速离心分离血清后,保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中待测。采用双抗体夹心酶联免疫测定法(ELISA)检测血清 IL-1 β 、IL-18 浓度,具体操作步骤严格按照说明书执行,ELISA 检测试剂盒购买于联科生物有限公司。

1.2.2 血液巨噬细胞 NLRP3 炎症复合体检测

收集不同组别患者血液标本,分离提取白细胞,PBS 洗涤细胞两次,5%多聚甲醛室温固定细胞 30min,10%山羊血清室温封闭 1h,然后兔抗人 NLRP3、凋亡相关微粒蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)、胱冬肽酶-1(Caspase-1)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日 TBST 洗涤细胞 3 次,PE-texas Red A 标记的抗兔二抗室温孵育 30min, PBST 洗涤细胞 3 次,双蒸水重悬细胞,转入流式管,BD LSR Fortessa 流式细胞仪筛选出巨噬细胞亚群,进一步检

测细胞表面 NLRP3、ASC、Caspase-1 荧光强度,软件分析并绘图。

统计学分析:采用 SPSS20.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布且方差齐,组间比较应用单因素方差分析,若差异有统计学意义,进行两两比较时采用 Dunnett-*t* 检验;两组间比较采用独立样本 *t* 检验。若差异无统计学意义,则不进行两两比较。计数资料采用率(%)表示,应用 χ^2 检验分析;对 IL-1、IL-18 浓度和 NLRP3 炎症复合体与 POAG 视野损伤程度的相关性采用 Spearman 相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 POAG 组与对照组 IL-1 β 、IL-18 浓度和 NLRP3 炎症复合体比较

POAG 组 IL-1 β 、IL-18 浓度显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步比较 NLRP3 炎症复合体阳性巨噬细胞比例,可见 POAG 组 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性细胞比例显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

2.2 POAG 组不同视野损伤患者 IL-1 β 、IL-18 浓度和 NLRP3 炎症复合体比较

A 组、B 组、C 组之间的 IL-1 β 、IL-18 对比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。进行两两比较,B 组及 C 组的血清中 IL-1 β 、IL-18 的水平高于 A 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);C 组血清中的 IL-1 β 、IL-18 水平高于 B 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。A 组、B 组、C 组之间的 NLRP3、ASC、Caspase-1 对比,差异有统计学意义($P<0.05$)。进行两两比较,B 组及 C 组血液中 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性细胞比例均高于 A 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);C 组血液中的 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性细胞比例的水平高于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 IL-1 β 、IL-18 浓度及 NLRP3 炎症复合体与 POAG 视野损伤相关性分析

POAG 患者血清中 IL-1 β 、IL-18 的浓度水平与视野损伤程度呈正相关($r=0.432, 0.765$, 均 $P<0.05$)。POAG 患者 NLRP3、ASC、Caspase-1 的阳性细胞比例与视野损伤程度呈正相关($r=0.517, 0.481, 0.340$, 均 $P<0.05$)。

3 讨论

NLRP3 炎症复合体是由 NLRP3、ASC、Caspase-1 组成的高分子蛋白复合物,在多种免疫细胞中均有表达,在血液循环中 NLRP3 炎症复合体在巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞中均有表达^[4]。目前认为,Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)等受体激活促进 NLRP3 炎症复合体的表达,是启动细胞炎症性死亡的第一信号途径。NLRP3 炎症复合体形成后,经 K⁺内流、ROS 产生等第二信号途径

表2 不同视野损伤患者 IL-1 β 、IL-18 浓度和 NLRP3 炎症复合体的变化 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)	NLRP3(%)	ASC(%)	Caspase-1(%)
A组	35	39.48 \pm 7.97	118.07 \pm 13.92	40.22 \pm 8.79	32.25 \pm 10.16	39.76 \pm 6.18
B组	16	43.37 \pm 6.22 ^a	125.66 \pm 18.19 ^a	46.39 \pm 9.09 ^a	37.99 \pm 9.24 ^a	43.66 \pm 7.82 ^a
C组	14	47.65 \pm 8.73 ^{a,c}	131.14 \pm 15.73 ^{a,c}	51.12 \pm 10.73 ^{a,c}	42.95 \pm 8.71 ^{a,c}	49.39 \pm 8.05 ^{a,c}
F		5.79	3.96	7.52	6.61	9.56
P		0.005	0.024	0.001	0.003	<0.001

注:A组:轻度损伤组;B组:中度损伤组;C组:重度损伤组。^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组。

激活,使 Caspase-1 裂解成活性形式,最终促进 IL-1 β 、IL-18 的成熟^[5]。

目前关于 POAG 的视神经损害机制仍有争议,多种机制可能均与 POAG 导致的视神经损害密切相关,其可能的机制包括机械损伤、神经毒性作用和免疫反应等多种复合作用的结果。无论何种机制导致的视神经损伤,视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的凋亡是引起损伤的共同最终途径。动物实验模型研究发现,如 IL-2R、IL-6、IL-10 等多种炎症抑制细胞因子对 RGCs 具有保护或者损伤作用,而 IL-1 β 、IL-18 炎症因子对 RGCs 的作用以及在 POAG 中导致的视神经损害的关系仍缺乏相关报道^[6-7]。因此,我们推测促进 IL-1 β 、IL-18 成熟的 NLRP3 炎症复合体可能与 POAG 导致的视神经损害密切相关,对 RGCs 的凋亡起到一定的促进作用。

在血液循环中,IL-1 β 、IL-18 的表达情况和 NLRP3 炎症复合体的形成与激活密切相关^[8]。由于免疫因素在 POAG 中的作用,因此探究 NLRP3 炎症复合体各个组分表达的第一信号途径亦具有重要意义。研究表明,NLRP3 炎症复合体与急性肺损伤、阿尔茨海默病、缺血性脑梗塞等多种疾病的发生发展密切相关^[9]。但是,目前 NLRP3 炎症复合体在 POAG 中的作用仍缺乏相关报道。Wang 等报道,IL-1 β 表达增加是 POAG 的重要危险因素,与视神经损伤密切相关^[10]。但是,NLRP3 炎症复合体以及 IL-18 在 POAG 中的作用仍不明确。通过我们的研究发现,POAG 患者中 IL-1 β 、IL-18 显著高于对照组,推测 POAG 可能存在 NLRP3 炎症复合体的过度激活。因此,我们进一步检测了血液中 NLRP3 炎症复合体激活的比例,发现 POAG 患者中 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性细胞比例明显高于对照组。

进一步研究 POAG 患者血清 IL-1 β 、IL-18 与视野损伤的相关性,发现青光眼患者血清中 IL-1 β 、IL-18 水平与视野损伤呈正相关,同时青光眼患者 NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性巨噬细胞比例与视野损伤亦呈正相关。

综上所述,本研究表明 POAG 患者不同视神经损伤阶段的血液巨噬细胞 NLRP3 炎症复合体的表达差异明显,视神经损伤越重,血清 IL-1 β 、IL-18 浓度越高,NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性巨噬细胞比例越大,NLRP3、ASC、Caspase-1 阳性巨噬细胞比例与视野损伤呈正相关。

参考文献

- 1 Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, *et al.* Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol* 2016;209:215-220
- 2 侯艳宏,崔红平. 新生血管性青光眼患者房水和血浆中 VEGF、TGF- β 和 IL-6 的测定及意义. *中华实验眼科杂志* 2016;34(7):624-629
- 3 颜珂,魏静. 血清 IL-6、IL-12 水平与原发开角型青光眼患者视神经损伤程度的相关性研究. *中国地方病防治杂志* 2017;32(3):358
- 4 Feng L, Liu X. NLRP3 inflammasome in retinal ganglion cell loss in optic neuropathy. *Neural Regen Res* 2016;11(7):1077-1078
- 5 Verdad CR, Kirschmann G, Marie P, *et al.* Neuropathic Pain Phenotype Does Not Involve the NLRP3 Inflammasome and Its End Product Interleukin-1 β in the Mice Spared Nerve Injury Model. *PLoS One* 2015;10(7):e0133707
- 6 张顺立,白倩,张倩,等. 醛糖还原酶基因敲除促进视神经损伤后巨噬细胞向 M2 方向极化并促进视神经功能恢复. *细胞与分子免疫学杂志* 2014;30(5):505-508
- 7 Liu H, Yeung OWH, Li CX, *et al.* NLRP3 Inflammasome Induced Liver Graft Injury through Activation of Telomere-independent RAP1/KC Axis. *J Pathol* 2017;242(3):284-296
- 8 岑令平,梁嘉健,张铭志. 巨噬细胞激活促进视神经损伤后修复的研究. *眼科* 2016;25(4):237-240
- 9 Dogan S, Unal M, Ozturk N, *et al.* Manganese porphyrin reduces retinal injury induced by ocular hypertension in rats. *Exp Eye Res* 2011;93(4):387-396
- 10 黄翠玲,李华,吕莎,等. 原发性急性闭角型青光眼患者外周血 IL-2 和 IL-6 水平与视神经损伤相关性分析. *国际眼科杂志* 2015;15(9):1583-1586