

呼吸机相关肺损伤患者 血清及诱导痰液 NLRP3 炎症小体的表达 及与其它炎症因子的相关性*

顾慧玲,王海峰,倪红燕,杨文林 (上海市第一人民医院宝山分院呼吸科,上海 200940)

摘要:目的 分析呼吸机相关肺损伤(VILI)患者血清及诱导痰液 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体及炎症因子的表达,探讨两者在 VILI 发病中的作用。方法 测定 76 例 VILI 患者及 30 例健康体检者(对照组)的血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体的表达,以及血清中白介素 1β (IL- 1β),IL-18,IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症指标。根据 Murray 肺损伤评分(LIS)将 VILI 患者分为两个亚组:轻、中度肺损伤组(LIS ≤ 2.5 分)、重度肺损伤组(LIS > 2.5 分)。分析各组 NLRP3 炎症小体与炎症因子的相关性。结果 轻中度肺损伤组、重度肺损伤组血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体表达水平明显高于对照组[血清:106.3 \pm 29.3,131.1 \pm 37.1 vs 79.2 \pm 27.3 pg/ml;诱导痰:95.1 \pm 24.4,119.2 \pm 36.7 vs 76.0 \pm 20.6 pg/ml],重度肺损伤组上述指标亦明显高于轻中度肺损伤组($t=3.82,4.03$,均 $P<0.05$)。与对照组比较,轻中度肺损伤组、重度肺损伤组血清中 IL- 1β (8.7 \pm 2.4,11.6 \pm 2.7 vs 5.5 \pm 1.9 pg/ml),IL-18(11.3 \pm 3.4,15.6 \pm 4.7 vs 4.5 \pm 1.3 pg/ml),IL-6(46.4 \pm 12.1,74.6 \pm 24.8 vs 6.4 \pm 1.8 pg/ml),TNF- α (16.1 \pm 4.4,22.8 \pm 5.1 vs 9.2 \pm 1.5 ng/ml)水平明显升高;与轻中度肺损伤组比较,重度肺损伤组血清中各炎症因子水平亦明显升高($t=4.87,4.62,7.94,5.33$,均 $P<0.05$)。轻中度肺损伤组患者血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体浓度与 IL- 1β ,IL-18 均呈显著正相关($P<0.05$)。重度肺损伤组患者血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体浓度与 IL- 1β ,IL-18,IL-6,TNF- α 均呈显著正相关($P<0.05$)。结论 VILI 患者血清、诱导痰中 NLRP3 表达明显上调,且与炎症因子密切相关,参与 VILI 的发生、发展,阻断 NLRP3 炎症小体的激活可能成为 VILI 的潜在治疗靶点。

关键词:呼吸机相关肺损伤;Nod 样受体蛋白 3 炎症小体;炎症因子

中图分类号:R563;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)01-097-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.01.025

Correlation of Serum and Phlegm NLRP3 Inflammasome in Patients with Ventilator-Induced Lung Injury with Other Inflammatory Cytokines

GU Hui-ling, WANG Hai-feng, NI Hong-yan, YANG Wen-lin

(Department of Clinical Laboratory,

Baoshan Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200940, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of serum and phlegm NLRP3 inflammasome and inflammatory cytokines in patients with ventilator-induced lung injury (VILI), and explore the role of NLRP3 inflammasome and inflammatory cytokines in the onset of VILI. **Methods** The expression of NLRP3 in serum and phlegm, serum inflammatory indicators including interleukin 1β (IL- 1β), IL-18, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) in 76 patients with VILI and 30 cases of healthy physical examination (control group) were detected. These patients were divided into two groups according to the Murray lung injury score (LIS), including mild and moderate lung injury group (LIS ≤ 2.5) and severe lung injury group (LIS > 2.5). The correlation between NLRP3 inflammasome and inflammatory cytokines was analyzed in each group. **Results** Compared with control group, the level of NLRP3 inflammasome in serum and phlegm in mild and moderate lung injury group and severe lung injury group were increased significantly serum 106.3 \pm 29.3, 131.1 \pm 37.1 vs 79.2 \pm 27.3 pg/ml, phlegm 95.1 \pm 24.4, 119.2 \pm 36.7 vs 76.0 \pm 20.6 pg/ml, and these indicators were also increased significantly in severe lung injury group compared with mild and moderate lung injury group ($t=3.82, 4.03$, all $P<0.05$). Compared with control group, the level of inflammatory cytokines in serum in mild and moderate lung injury group and severe lung injury group were increased significantly, and these indicators such as IL- 1β (8.7 \pm 2.4, 11.6 \pm 2.7 vs 5.5 \pm 1.9 pg/ml), IL-18 (11.3 \pm 3.4, 15.6 \pm 4.7 vs 4.5 \pm 1.3 pg/ml), IL-6 (46.4 \pm 12.1, 74.6 \pm 24.8 vs 6.4 \pm 1.8 pg/ml), TNF- α (16.1 \pm 4.4, 22.8 \pm 5.1 vs 9.2 \pm 1.5 ng/ml) were also increased significantly in severe lung injury group compared with mild and moderate lung injury group ($F=105.24, 80.05, 148.22$ and 83.44 , all $P<0.05$). NLRP3 inflammasome in serum and phlegm in patients

* 基金项目:上海市宝山区科学技术委员会(编号:14-E-12)。

作者简介:顾慧玲(1979—),女,在职研究生,主治医师,研究方向:肺部感染,E-mail:y_huiling1@126.com。

with mild to moderate lung injury group were significantly positive correlated with IL-1 β and IL-18 ($P < 0.05$). There was significant correlation between NLRP3 inflammasome in serum and phlegm in patients with severe lung injury group with IL-1 β , IL-18, IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$). **Conclusion** NLRP3 inflammasome in serum and phlegm of patients with VILI was over-expressed, and the expression of NLRP3 inflammasome and inflammatory cytokines was positively correlated, could be involved in the occurrence and development of VILI. Blocking the activation of NLRP3 inflammasome is expected to be as a new target in the treatment of VILI.

Keywords: ventilator-induced lung injury; NLRP3 inflammasome; inflammatory cytokines

近年来,机械通气(MV)作为一种重要的生命支持手段已在临床领域广泛应用,但运用不当极易引起甚至加重肺损伤—呼吸机相关性肺损伤(ventilator induced lung injury, VILI)。VILI是MV的严重并发症,在异常机械力刺激下,肺泡上皮细胞激活肺泡巨噬细胞等炎性细胞导致炎性因子大量释放,从而介导失控的“瀑布式”炎症反应^[1,2],对危重症患者的预后造成严重影响,病死率高达30%~42%^[3]。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎症小体作为固有免疫系统的一种模式识别受体,大量研究已表明其参与到自身免疫疾病和感染性疾病,但其与非感染性疾病的相关性尚缺乏足够证据^[4,5]。本研究拟通过检测VILI患者血清和诱导痰中NLRP3炎症小体及相关炎性因子表达水平的变化,探讨NLRP3炎症小体在VILI中的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2014年1月~2017年12月在上海市第一人民医院宝山分院呼吸科及急诊科收治入院行MV治疗的VILI患者,共76例。入组标准:①均符合中华医学会呼吸分会制订的急性肺损伤诊断标准^[6],并根据临床表现、胸部CT及动脉血气等明确;②年龄 ≥ 18 岁, MV时间 > 24 h;③排除创伤性肺损伤、气胸、濒死状态(预计12h内死亡)或并发严重器官功能障碍。其中男性35例,女性41例,年龄43~75(54.7 ± 6.2)岁;Murray肺损伤评分(LIS)^[7] 1.8 ± 0.6 分。根据LIS评分,分为两个亚组:轻、中度肺损伤组47例($LIS \leq 2.5$ 分),重度肺损伤组29例($LIS > 2.5$ 分)。另外在相同时期选择我院体检中心的健康体检者30例作为对照组。其中男性15例,女性15

例,年龄40~75(53.5 ± 4.9)岁。各组对象年龄、性别构成比等差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 痰的诱导及处理:所有受试者咳痰后漱口,吸入沙丁胺醇200 μ g。随即以3 g/dl高渗盐水射流雾化吸入,收集痰液。于痰液中加入等量0.1ml/dl二硫苏糖醇液,充分振荡化开。取少许(约50 μ l)做细胞计数,其余离心,将上清液分装保存在-20℃冰箱中待测。

1.2.2 炎性因子检测:分别抽取VILI患者、对照组空腹肘静脉血3 ml,置于含枸橼酸盐的抗凝管中,3 000 r/min离心10~15 min后留取上层血清置于-20℃冰箱中备用。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测白介素1 β (IL-1 β), IL-18, IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。试剂盒由美国TPI公司生产。

1.2.3 NLRP3炎症小体检测:采用ELISA双抗夹心法检测诱导痰和血清中NLRP3炎症小体表达水平。试剂盒由美国TPI公司生产。

1.3 统计学分析 应用SPSS 17.0版统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析,采用Pearson相关进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清、诱导痰中NLRP3炎症小体表达水平比较 见表1。各组血清、诱导痰中NLRP3炎症小体表达水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。轻中度肺损伤组、重度肺损伤组血清、诱导痰中NLRP3炎症小体表达水平明显高于对照组,重度肺损伤组上述指标亦明显高于轻中度肺损伤组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组血清、诱导痰中NLRP3炎症小体表达水平比较($\bar{x} \pm s$ pg/ml)

指 标	对照组($n=30$)	轻中度肺损伤组($n=47$)	重度肺损伤组($n=29$)	F	P	t_1	P_1	t_2	P_2	t_3	P_3
血清NLRP3	79.2 \pm 27.3	106.3 \pm 29.3	131.1 \pm 37.1	20.56	<0.05	4.12	<0.05	7.23	<0.05	3.82	<0.05
诱导痰NLRP3	76.0 \pm 20.6	95.1 \pm 24.4	119.2 \pm 36.7	18.39	<0.05	3.55	<0.05	6.36	<0.05	4.03	<0.05

注: t_1, P_1 :轻中度肺损伤组与对照组比较; t_2, P_2 :重度肺损伤组与对照组比较; t_3, P_3 :轻中度肺损伤组与重度肺损伤组比较。

2.2 各组血清炎性因子水平比较 见表2。方差分析显示,各组血清IL-1 β , IL-18, IL-6和TNF- α 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对

照组比较,轻中度肺损伤组、重度肺损伤组血清中各炎性因子水平明显升高,与轻中度肺损伤组比较,重度肺损伤组血清中各炎性因子水平亦明显升

高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表2 各组血清炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

指标	对照组($n=30$)	轻中度肺损伤组($n=47$)	重度肺损伤组($n=29$)	F	P	t_1	P_1	t_2	P_2	t_3	P_3
IL-1 β (pg/ml)	5.5 \pm 1.9	8.7 \pm 2.4 ^①	11.6 \pm 2.7 ^{①②}	105.24	<0.05	6.17	<0.05	9.02	<0.05	4.87	<0.05
IL-18(pg/ml)	4.5 \pm 1.3	11.3 \pm 3.4 ^①	15.6 \pm 4.7 ^{①②}	80.05	<0.05	10.46	<0.05	17.38	<0.05	4.62	<0.05
IL-6(pg/ml)	6.4 \pm 1.8	46.4 \pm 12.1 ^①	74.6 \pm 24.8 ^{①②}	149.22	<0.05	41.48	<0.05	58.92	<0.05	7.94	<0.05
TNF- α (ng/ml)	9.2 \pm 1.5	16.1 \pm 4.4 ^①	22.8 \pm 5.1 ^{①②}	83.44	<0.05	16.76	<0.05	23.09	<0.05	5.33	<0.05

注: t_1, P_1 :轻度肺损伤组与对照组比较; t_2, P_2 :重度肺损伤组与对照组比较; t_3, P_3 :轻中度肺损伤组与重度肺损伤组比较。

2.3 NLRP3 炎症小体与炎症因子表达水平的相关性分析 见表3。Pearson 相关性分析显示,轻中度肺损伤组患者血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体浓度与 IL-1 β , IL-18 均呈显著正相关,而与 IL-

6, TNF- α 无显著相关性($P>0.05$)。重度肺损伤组患者血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体浓度与 IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α 均呈显著正相关($P<0.05$)。

表3 VILI 患者 NLRP3 炎症小体与炎症因子表达水平的相关性

指标	轻中度肺损伤组 NLRP3				重度肺损伤组 NLRP3			
	血清		诱导痰		血清		诱导痰	
	r	P	r	P	r	P	r	P
IL-1 β	0.399	<0.05	0.418	<0.05	0.435	<0.05	0.420	<0.05
IL-18	0.304	<0.05	0.336	<0.05	0.387	<0.05	0.407	<0.05
IL-6	0.272	>0.05	0.314	>0.05	0.405	<0.05	0.388	<0.05
TNF- α	0.319	>0.05	0.322	>0.05	0.394	<0.05	0.381	<0.05

3 讨论 机械通气(MV)是治疗急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合症不可缺少的重要手段之一。由于长时间、反复、强制性气道高压和高容量造成肺泡、小气道结构过度扩张等肺机械性损伤,进而诱发炎症渗出、肺水肿、肺间质纤维化及肺泡表面活性物质失活等肺炎症性损伤,常见的 VILI 包括气压伤、萎陷伤、容积伤和生物伤四种类型^[8]。肺组织细胞机械性损伤如何转化为细胞内生物信号,引起肺组织无菌性炎症性损伤的机制尚不十分明确^[9]。最近有研究报道显示, NLRP3 炎症小体作为 NLRs 家族的一个重要成员,由 NLRP3, 凋亡相关斑点样蛋白、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 组成,不仅可以识别入侵的细菌等病原体所致固有免疫应答,也可能参与到某些无菌性炎症反应中^[10,11],但目前多数研究集中于动物实验阶段。

LIS 评分最早由 Murray 于 1988 年提出,是目前国际上评估 ALI 较为权威的方法,其与肺脏受累范围密切相关,能够对肺损伤程度进行量化评估,同时有助于研究疾病的发展过程。本研究根据 LIS 进行 VILI 病情分组,结果显示轻中度肺损伤组、重度肺损伤组血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体表达水平明显高于对照组,重度肺损伤组上述指标亦明显高于轻中度肺损伤组($P<0.05$),与 Jones 等^[11]研究结果基本一致,进一步证实了 MV

导致 VILI 的发生,且随着肺损伤的严重程度增加而升高。此外, VILI 患者血清中各炎症因子水平也明显升高,且肺损伤越重,其水平越高($P<0.05$)。有研究数据显示,在全麻下 MV 3 h 后,患者炎症因子释放明显增加,其原因可能为机体肺防御功能下降和炎症轻度改变^[12,13]。由此我们推测, NLRP3 可能参与了 VILI 的发生,其水平升高可能作为 VILI 的早期辅助诊断指标,对优化通气策略具有一定指导意义。

相关性分析显示, VILI 患者血清、诱导痰中 NLRP3 炎症小体浓度与炎症因子,尤其是其下游炎症因子 IL-1 β , IL-18 呈显著正相关($P<0.05$),对于重度 VILI 患者而言,二者的相关性更为凸显,再次证实了 NLRP3 炎症小体激活在 VILI 的发生及病情进展中发挥着重要作用^[14]。Ko 等^[15]研究认为,大潮气量 MV 刺激可激活 NLRP3 炎症小体各组分之间的级联反应,识别并结合胞内外配体,启动信号传递,通过 MyD88 通路激活 IKK β -NF- κ B 诱导其下游炎症因子 IL-1 β , IL-18 及其他炎症因子的合成与分泌增多,进而介导肺部急性炎症反应。

综上所述, VILI 患者血清、诱导痰中 NLRP3 表达明显上调,且与炎症因子密切相关, NLRP3 介导了大量炎症因子释放,参与 VILI 的发生、发展,

阻断 NLRP3 的激活可能成为 VILI 的潜在治疗靶点。

参考文献:

- [1] NEEDHAM D M, COLANTUONI E, MENDEZTE-LLEZ P A, et al. Lung protective mechanical ventilation and two year survival in patients with acute lung injury: prospective cohort study[J]. *BMJ*, 2012, 344: e2124.
- [2] TRESCHAN T A, KAISERS W, SCHAEFER M S, et al. Ventilation with low tidal volumes during upper abdominal surgery does not improve postoperative lung function[J]. *Br J Anaesth*, 2012, 109(2): 263-271.
- [3] 赵婷婷, 刘虹. 呼吸机相关肺损伤的研究进展[J]. 临床医药文献杂志(电子版), 2017, 4(49): 9701-9702.
ZHAO Tingting, LIU Hong. Advances in research on ventilator-related lung injury[J]. *Journal of Clinical Medical Literature(Electronic Edition)*, 2017, 4(49): 9701-9702.
- [4] ZHENG F, XING S S, GONG Z S, et al. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014(1): 507208.
- [5] WANG H Y, LÜ C E, WANG S, et al. NLRP3 inflammasome involves in the acute exacerbation of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Inflammation*, 2018, 11(6): 1-13.
- [6] 中华医学会呼吸病学分会. 急性肺损伤, 急性呼吸窘迫综合征的诊断标准(草案)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2000, 23(4): 203.
Chinese Thoracic Society of Respiratory Medicine. Diagnostic criteria for acute lung injury, acute respiratory distress syndrome (draft)[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2000, 23(4): 203.
- [7] 张国强, 顾承东, 朱宇清, 等. 急性生理学 and 慢性健康状况评分与急性肺损伤评分在重症 SARS 患者中的应用[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(9): 802-804.
ZHANG Guoqiang, GU Chengdong, ZHU Yuqing, et al. Comparison between tow methods of acute physiology and chronic health evaluation III and acute lung injury scale to evaluate the severity and prognosis of severe acute respiratory syndrome[J]. *International Journal of Epidemiol*, 2004, 25(9): 802-804.
- [8] 黄絮, 詹庆元. 呼吸机相关肺损伤的发生机制 and 处理对策[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(6): 471-473.
- HUANG Xu, ZHAN Qingyuan. Mechanism and treatment of ventilator-related lung injury[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2014, 37(6): 471-473.
- [9] 孟凡凡, 齐晓林, 黄奕江, 等. 乌司他丁干预对水下爆炸致兔急性肺损伤 TNF- α 表达的影响[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(3): 131-132, 136.
MENG Fanfan, QI Xiaolin, HUANG Yijiang, et al. Effect of ulinastatin on the expression of TNF- α in the rabbits with acute lung injury induced by underwater explosion[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(3): 131-132, 136.
- [10] FUKUMOTO J, FUKUMOTO I, PARTHASARTHY P T, et al. NLRP3 deletion protects from hyperoxia-induced acute lung injury[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(2): 182-189.
- [11] 刘文秀, 尹新华. NLRP3 炎性体与心血管病的研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2014, 37(2): 97-100.
LIU Wenxiu, YIN Xinhua. The research progress of NLRP3 inflammasomes and cardiovascular diseases[J]. *International Journal of Immunology*, 2014, 37(2): 97-100.
- [12] JONES H D, CROTHER T R, GONZALEZ-VILLALOBOS R A, et al. The NLRP3 inflammasome is required for the development of hypoxemia in LPS/mechanical ventilation acute lung injury[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(2): 270-280.
- [13] WU J B, YAN Z B, SCHWARTZ D E, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury[J]. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3590-3599.
- [14] DEY N, SINHA M, GUPTA S, et al. Caspase-1/ASC inflammasome mediated activation of IL-1 β -ROS-NF- κ B pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3^{-/-} macrophages [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111539.
- [15] QIAO Y, WANG P, QI J N, et al. TLP-induced NF-kappa B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages [J]. *FEBS letters*, 2012, 586(7): 1022-1026.
- [16] KO Y A, YANG M C, HUANG H T, et al. NF-kappa B activation in myeloid cells mediates ventilator-induced lung injury[J]. *Respir Res*, 2013, 14(12): 69-75.