

NLRP3/IL-1 β 通路在增殖性糖尿病视网膜病变中的作用机制

肖云兰,冯霞

引用:肖云兰,冯霞. NLRP3/IL-1 β 通路在增殖性糖尿病视网膜病变中的作用机制.国际眼科杂志 2019;19(9):1559-1562

作者单位:(250022) 中国山东省济南市,山东省立医院西院眼科
作者简介:肖云兰,本科,副主任医师,研究方向:白内障、眼表疾病、糖尿病眼病。

通讯作者:肖云兰.xiaoyl000896@163.com

收稿日期:2019-03-11 修回日期:2019-08-08

摘要

目的:探究核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3)/白介素-1 β (IL-1 β) 通路在增殖性糖尿病视网膜病变中的作用机制。

方法:收集 2015-09/2018-03 我院眼科收治的增殖性糖尿病视网膜病变患者 49 例 49 眼(研究组)和特发性黄斑裂孔患者 41 例 41 眼(对照组)。检测研究组患者视网膜增殖前膜与对照组患者黄斑前膜中 NLRP3 蛋白表达情况、活性氧簇(ROS)、丙二醛(MDA)水平与超氧化物歧化酶(SOD)活性,测定两组患者玻璃体中 IL-1 β 与 IL-18 浓度。

结果:研究组患者视网膜增殖前膜中 NLRP3 蛋白阳性表达率明显高于对照组患者黄斑前膜(90% vs 5%, $P < 0.05$),且研究组患者视网膜增殖前膜中 ROS 与 MDA 水平明显升高,而 SOD 活性明显降低。研究组患者玻璃体中 IL-1 β 、IL-18 浓度(30.84 \pm 7.15, 97.61 \pm 15.73pg/mL)均明显高于对照组(4.63 \pm 0.92, 52.07 \pm 11.38pg/mL)。

结论:NLRP3 与 IL-1 β 在增殖性糖尿病视网膜病变组织中呈高表达,NLRP3/IL-1 β 通路可上调炎性因子与氧化因子表达水平,促进疾病发展。

关键词:NLRP3/IL-1 β 通路;糖尿病;视网膜病变;炎性因子;氧化损伤

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.9.26

Mechanism of NLRP3/IL-1 β pathway in the progression of diabetic retinopathy

Yun-Lan Xiao, Xia Feng

Department of Ophthalmology, Shandong Provincial Western Hospital, Jinan 250022, Shandong Province, China

Correspondence to: Yun-Lan Xiao. Department of Ophthalmology, Shandong Provincial Western Hospital, Jinan 250022, Shandong Province, China. xiaoyl000896@163.com

Received:2019-03-11 Accepted:2019-08-08

Abstract

• **AIM:** To explore the mechanism of action of nucleotide-

binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3)/interleukin-1 β (IL-1 β) pathway in proliferative diabetic retinopathy.

• **METHODS:** Totally 49 cases (49 eyes) of proliferative diabetic retinopathy (study group) and 41 cases (41 eyes) of idiopathic macular hole (control group) in ophthalmology department of our hospital from September 2015 to March 2018 were selected. The expression of NLRP3, the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in proliferative epiretinal membrane and macular epiretinal membrane were measured. The concentrations of IL-1 β and interleukin-18 (IL-18) in the vitreous of the two groups were also determined.

• **RESULTS:** The positive expression rate of NLRP3 protein in the study group was significantly higher than that in the control group (90% vs 5%, $P < 0.05$). The concentration of IL-1 β and IL-18 in the vitreous of the study group was significantly higher than that in the control group [(30.84 \pm 7.15) vs (4.63 \pm 0.92); (97.61 \pm 15.73) pg/mL vs (52.07 \pm 11.38) pg/mL, $P < 0.05$]. The levels of ROS and MDA of the study group were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). The activity of SOD in the retina of the study group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** NLRP3 and IL-1 β are highly expressed in proliferative diabetic retinopathy. The NLRP3/IL-1 β pathway can up-regulate the expression levels of inflammatory and oxidative factors and promote disease progression.

• **KEYWORDS:** NLRP3/IL-1 β pathway; diabetes mellitus; retinopathy; inflammatory factors; oxidative damage

Citation: Xiao YL, Feng X. Mechanism of NLRP3/IL-1 β pathway in the progression of diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(9):1559-1562

0 引言

糖尿病是一种严重危害人类健康的全身性疾病,其危害程度仅次于心血管疾病与恶性肿瘤^[1]。糖尿病发病机制为胰岛素分泌绝对或相对不足,导致血糖代谢异常,进而引起全身组织出现慢性损伤与功能障碍^[2]。由于糖尿病患者长期处于高血糖状态,刺激微血管,导致视网膜受损。研究发现,中国有超过 40% 的糖尿病患者出现糖尿病视网膜病变,且糖尿病视网膜病变是成年人最常见的失明原因之一^[3-4]。故而探究糖尿病视网膜病变的发病机制,提出有效治疗方法,对糖尿病视网膜病变患者具有重要意

义。核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors 3, NLRP3) 是炎症小体家族成员,具有胞浆识别作用^[5]。NLRP3 激活后可诱导炎症因子产生,降低细胞在高糖环境中的生存能力。既往研究对 NLRP3 在胰岛素抵抗与糖尿病发生的关系进行了深入探讨,但关于其在糖尿病视网膜病变中的作用鲜有研究。本研究旨在探究 NLRP3/IL-1 β 通路在糖尿病视网膜病变中的作用机制,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 前瞻性研究。收集 2015-09/2018-03 我院眼科收治的增殖性糖尿病视网膜病变患者 49 例 49 眼作为研究组,其中男 27 例,女 22 例,年龄 38~67(平均 43.57 \pm 9.82)岁。纳入标准:(1)经内分泌科确诊为 2 型糖尿病;(2)眼底血管造影和三面镜等眼科专科检查结果符合 2002 年版国际眼科学术会议提出的增殖性糖尿病视网膜病变诊断标准^[6];(3)无眼部炎症性疾病。排除标准:(1)继发性糖尿病;(2)妊娠期女性;(3)依从性低,不能配合检查;(4)近 3mo 内有眼部外伤史。收集同期来我院进行手术治疗的特发性黄斑裂孔患者 41 例 41 眼作为对照组,其中男 24 例,女 17 例,年龄 39~65(平均 42.91 \pm 9.54)岁。纳入标准:(1)经光学相干断层扫描与前置镜散瞳眼底检查明确诊断为特发性黄斑裂孔 II~IV 期并进行手术治疗者;(2)近 1mo 内无慢性泪囊炎、感染性角膜炎及角膜溃疡等眼部感染性疾病;(3)能积极配合检查。排除标准:(1)合并糖尿病;(2)黄斑裂孔形成时间超过 1a;(3)不能耐受手术。两组患者性别构成比、年龄等一般资料差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究符合我院医学伦理委员会相关标准,并获得批准。所有受试者及家属对本研究充分知情,并自愿签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 样本收集 所有患者均进行血常规、尿常规、凝血功能、血糖等术前常规检查,确认无手术禁忌后,根据患者情况,采用 20g/L 利多卡因注射液行球后阻滞麻醉或行全身麻醉,行睫状体平坦部三通道闭合式玻璃体切除术,小心剥除研究组患者视网膜增殖前膜与对照组患者黄斑前膜,术中采用无菌注射器抽取每位患者 0.5mL 玻璃体原液。

1.2.2 观察指标 分别采用免疫组织化学法检测视网膜增殖前膜与黄斑前膜中 NLRP3 蛋白表达水平,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定视网膜增殖前膜与黄斑前膜中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平,分别采用硫代巴比妥酸法与黄嘌呤法检测视网膜增殖前膜与黄斑前膜中丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平与超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,采用 ELISA 法检测玻璃体中白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)与白介素-18(interleukin-18, IL-18)水平。本研究所有试剂盒均购于南京森贝伽生物科技有限公司。

1.2.2.1 免疫组织化学法 将收集的组织经固定、脱水、透明,并用石蜡包埋成块,使用组织切片机(德国 Leica, CM1850)将其加工为厚度约 4 μ m 的连续切片,依次进行脱蜡、抗原修复及过氧化氢酶阻断,加山羊血清(北京博胜经纬科技有限公司)进行封闭。滴加兔抗人 NLRP3 多克隆抗体(武汉博欧特生物科技有限公司,1:100),置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜,漂洗后加羊抗兔 IgG(北京博尔西科技有限公司)37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5h,再次漂洗,DAB 显色(上海康

朗生物科技有限公司),苏木精(上海研谨生物科技有限公司)复染,经梯度酒精脱水及中性树脂封片。由两位具有执业资格的病理科医生独立采用双盲法对染色结果进行观察,避开出血、坏死及刀口区,随机选取 10 个包含 100 个细胞的视野进行观察。

1.2.2.2 ELISA 法 将术中收集的玻璃体原液经低温高速离心机以 3000r/min 的转速处理 15min 后,留取上清液,加入反应板孔中,根据试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪(南京德铁实验设备有限公司, HBS-1096A)测定 450nm 波长下的吸光度值并绘制标准曲线,根据相应吸光度值于标准曲线上确定 ROS、IL-1 β 、IL-18 相应浓度。

1.2.2.3 硫代巴比妥酸法 将收集的组织充分剪碎匀浆,加入 2 倍体积的蒸馏水充分摇匀,留过滤后液体备用。按照试剂盒说明书进行相应操作后,取 2mL 样液于 10mL 比色管中,采用紫外分光光度计(上海谱元仪器有限公司, 1900Plus)测定在 530nm 波长下的吸光度值并绘制标准曲线,根据相应吸光度值于标准曲线上确定 MDA 相应浓度。

1.2.2.4 黄嘌呤法 将收集的组织充分剪碎匀浆,按照试剂盒说明书,依次加入试剂后充分混匀,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 0.5h。加入 0.2mL 显色剂后于室温下静置 10min,检测 550nm 波长下的吸光度值并计算 SOD 活性。

统计学分析: 本研究所有数据统计与分析均采用 SPSS20.0 软件。计数资料采用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。计量资料均符合正态分布,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。当 $P<0.05$ 提示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NLRP3 蛋白表达情况 免疫组织化学检测结果显示,NLRP3 蛋白阳性表达呈蓝色(图 1)。研究组患者中视网膜增殖前膜 NLRP3 阳性表达者占 90%(44/49),对照组患者中黄斑前膜 NLRP3 阳性表达者占 5%(2/41),差异有统计学意义($\chi^2=64.418, P<0.001$)。

2.2 IL-1 β 和 IL-18 浓度比较 研究组患者玻璃体中 IL-1 β 、IL-18 浓度(30.84 \pm 7.15、97.61 \pm 15.73pg/mL)均明显高于对照组(4.63 \pm 0.92、52.07 \pm 11.38pg/mL),差异均有统计学意义($t=23.290, 15.454$, 均 $P<0.05$)。

2.3 ROS 和 MDA 水平及 SOD 活性比较 研究组患者视网膜增殖前膜中 ROS 与 MDA 水平均较对照组患者黄斑前膜明显升高,但 SOD 活性较对照组明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

3 讨论

糖尿病是一种由于胰岛素分泌减少或生物作用降低引起的代谢紊乱性疾病,其最主要的特征为血糖异常升高^[1]。目前糖尿病尚无根治办法,仅能控制血糖水平,延缓疾病发展^[7]。流行病学调查显示,继心血管疾病与恶性肿瘤之后糖尿病已成为危害人类健康的第三类慢性非传染性疾病^[1]。由于长期处于高血糖水平,糖尿病患者易发生肾、眼、血管与神经病变。糖尿病患者微血管病变最常见的症状为糖尿病视网膜病变导致的视力受损^[3]。

目前关于糖尿病视网膜病变机制尚未完全明确,但多数学者就炎症反应是糖尿病视网膜病变的重要过程达成共识^[8]。郭译依等^[9]研究发现,炎症因子与视网膜细胞死亡及视网膜功能密切相关。Maimaiti 等^[10]研究指出,炎症因子浸润会导致糖尿病视网膜病变进一步加剧。NLRP3

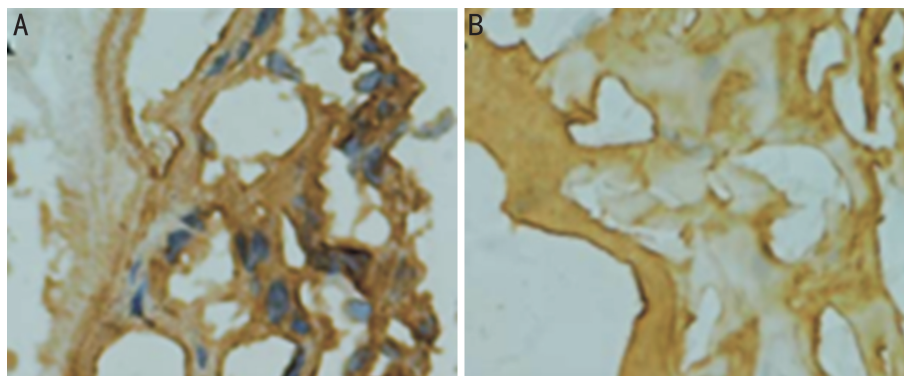


图1 免疫组织化学法检测 NLRP3 蛋白的表达($\times 400$) A: NLRP3 蛋白在视网膜增殖前膜中表达呈阳性(蓝色为阳性表达); B: NLRP3 蛋白黄斑前膜呈阴性表达。

表1 两组患者 ROS 和 MDA 水平及 SOD 活性比较

组别	眼数	ROS(U/mL)	MDA(nmol/mg)	SOD 活性(U/mL)	$\bar{x} \pm s$
研究组	49	31.52 \pm 5.81	15.06 \pm 1.92	69.27 \pm 11.41	
对照组	41	12.74 \pm 4.59	7.34 \pm 1.38	116.96 \pm 26.22	
<i>t</i>		16.772	21.506	11.506	
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	

注:研究组:增殖性糖尿病视网膜病变患者;对照组:特发性黄斑裂孔患者。

是一种胞浆模式识别受体分子,作为炎性小体家族一员, NLRP3 可与凋亡相关颗粒样蛋白及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1 形成炎性复合物^[11]。活化的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1 可剪切 IL-1 β 与 IL-18 前体,形成具有活性的 IL-1 β 与 IL-18^[12]。IL-1 β 是一种致炎性因子,其水平异常升高可导致组织水肿与破坏^[13]。此外, IL-1 β 除了对胰岛 B 细胞具有直接破坏作用,还能通过诱导一氧化氮等有毒物质的产生,间接损伤胰岛细胞^[14]。IL-18 是具有多种生物学效应的细胞因子,其能促进白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)产生,介导前期炎症反应。同时, IL-18 促进 Fas 系统介导的细胞凋亡^[15]。本研究发现, NLRP3 蛋白在研究组患者中的阳性表达率为 90%,明显高于对照组(5%),提示 NLRP3 蛋白在糖尿病视网膜病变患者视网膜增殖前膜中呈高表达。同时,本研究发现研究组患者玻璃体中 IL-1 β 与 IL-18 浓度明显大于对照组患者,提示糖尿病视网膜病变过程中 NLRP3/IL-1 β 通路活跃,通过提高炎症因子的表达加快视网膜病变进程。

张子怡等^[16]研究发现, NLRP3 可增加细胞 ROS 的释放,加重组织氧化损伤。ROS 是引起机体氧化应激的主要因素。生理状态下,适当水平的 ROS 具有传导细胞信号的作用,而 ROS 水平异常升高可导致细胞损伤,甚至诱导细胞凋亡^[17]。MDA 是细胞膜上脂质过氧化的重要产物之一,是脂质过氧化的标志。故而临床常将 MDA 水平用于评价氧化损伤程度^[18]。SOD 是清除体内氧自由基的首要物质,其可对抗氧自由基对细胞的损伤作用,同时对已经遭受氧自由基损伤的细胞具有修复作用。SOD 活性越高,提示 SOD 对氧自由基的清除作用越强^[19]。本研究发现,研究组患者视网膜增殖前膜中 ROS 与 MDA 水平明显高于对照组黄斑前膜,且 SOD 活性明显低于对照组,提示 NLRP3/IL-1 β 通路可增加氧化因子表达水平,加剧视网膜氧化损伤,这与张子怡等^[16]研究结果一致。

综上所述, NLRP3 与 IL-1 β 在增殖性糖尿病视网膜病变组织中呈高表达; NLRP3/IL-1 β 通路可上调炎症因子与氧化因子表达水平,加快疾病进程。

参考文献

- 1 Micha R, Peñalvo JL, Cudhea F, *et al.* Association Between Dietary Factors and Mortality From Heart Disease, Stroke, and Type 2 Diabetes in the United States. *JAMA* 2017; 317(9): 912-924
- 2 Solomon SD, Chew E, Duh EJ, *et al.* Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017; 40(9): 412-418
- 3 李疏凤, 胡健艳, 李婷婷, 等. 糖尿病视网膜病变神经损伤的病理改变及其相关分子机制的研究现状与进展. *中华眼底病杂志* 2017; 33(3): 298-301
- 4 Pires R, Avila S, Jelinek H, *et al.* Beyond Lesion-based Diabetic Retinopathy: a Direct Approach for Referral. *IEEE J Biomed Health Inform* 2017; 21(1): 193-200
- 5 柴广睿, 刘姝, 陈晓隆. 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症体在眼科疾病中的研究进展. *眼科新进展* 2018; 38(9): 892-897
- 6 韩林峰, 柯根杰, 王林, 等. 全视网膜激光光凝对增生型糖尿病视网膜病变视网膜前膜中环氧合酶-2、血管内皮生长因子表达的影响. *中华眼底病杂志* 2016; 32(2): 140-143
- 7 Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, *et al.* Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28(4): 1023-1039
- 8 李芸云, 刘宁朴. 脂联素与糖尿病视网膜病变相关性研究现状. *中华眼底病杂志* 2017; 33(3): 324-327
- 9 郭译依, 孙晓东. 炎症凋亡与视网膜细胞死亡相关机制的研究进展. *中华眼底病杂志* 2018; 34(2): 201-204
- 10 Maimaiti NG, Tuhuti A. Changes of serum inflammatory factors, adipokines and oxidative stress in patients with diabetic retinopathy. *J Hainan Med University* 2017; 23(15): 27-30
- 11 Lazaridis LD, Pistiki A, Giamarellos-Bourboulis EJ, *et al.* Activation of NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Bowel Disease: Differences Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2017; 62(9): 2348-2356

12 Li YF, Nanayakkara G, Sun Y, *et al.* Analyses of caspase-1-regulated transcriptomes in various tissues lead to identification of novel IL-1 β -, IL-18- and sirtuin-1-independent pathways. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 40
13 Natoli R, Fernando N, Madigan M, *et al.* Microglia-derived IL-1 β promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Mol Neurodegener* 2017; 12(1): 31
14 靳育静, 孙晓薇, 李晓通, 等. 白细胞介素 1 在介导人胰岛淀粉样多肽对胰岛细胞毒性中的作用及机制. *中国糖尿病杂志* 2017; 9(3): 179-183
15 Opend Bosch NV, Gorp HV, Verdonck M, *et al.* Caspase-1 Engagement and TLR-Induced c-FLIP Expression Suppress ASC/Caspase-8-Dependent Apoptosis by Inflammasome Sensors NLRP1b and

NLRP4. *Cell Rep* 2017; 21(12): 3427-3444
16 张子怡, 薄海, 杨爽, 等. NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎性小体在低氧诱导骨骼肌线粒体损伤中的作用. *中国组织工程研究* 2017; 21(28): 90-95
17 高健美, 李德芬, 牛爽, 等. 金丝桃苷对过氧化氢诱导的 A549 细胞氧化损伤的保护作用. *中国实验方剂学杂志* 2017; 23(11): 128-133
18 张妮, 曹慧敏, 宋囡, 等. 丹参酮 II A 通过调节自噬小体对 ox-LDL 诱导内皮细胞氧化应激损伤的保护作用. *中国动脉硬化杂志* 2017; 25(3): 244-249
19 Liu H, Peng H, Xiang H, *et al.* TWEAK/Fn14 promotes oxidative stress through AMPK/PGC1 α /MnSOD signaling pathway in endothelial cells. *Mol Med Rep* 2018; 17(1): 1998

国际眼科杂志中文版 (IES) 近 5 年影响因子趋势图

