

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.14.026
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20220711.1708.012.html(2022-07-12)

胆管癌患者组织中 NLRP3 炎性小体的表达水平 与其临床病理特征及预后的关系

余和斌,蒙喜云,郭 勇[△]
(重庆市长寿区人民医院肝胆外科 401220)

[摘要] **目的** 探讨 NLRP3 炎性小体在胆管癌组织中的表达水平及其与临床病理特征和预后的关系。**方法** 收集 2016 年 4 月至 2018 年 4 月该院收治的 142 例行手术切除的胆管癌患者和 40 例正常胆管上皮组织的非胆管癌患者(对照组)的临床资料。实时荧光定量 PCR 检测胆管癌组和对照组组织核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎性小体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(caspase-1) mRNA 水平,ELISA 法测定上清液白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 水平,单因素和多因素 Cox 回归分析胆管癌患者生存预后的独立影响因素,Kaplan-Meier 和 Log-rank 法进行预后分析。**结果** 与对照组比较,胆管癌组患者 NLRP3 炎性小体和 caspase-1 mRNA、IL-1 β 及 IL-18 水平明显升高($P<0.05$)。胆管癌组 NLRP3 炎性小体高表达与 TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移及脉管侵犯有关($P<0.05$)。NLRP3 炎性小体高表达患者 3 年生存率 25.86%(15/58)低于 NLRP3 炎性小体低表达患者 55.95%(47/84),差异有统计学意义($\chi^2=10.95,P<0.001$)。多因素 Cox 回归分析显示,TNM 分期、分化程度、淋巴结转移及 NLRP3 炎性小体高表达是影响胆管癌患者生存预后的独立因素($P<0.05$)。**结论** NLRP3 炎性小体在胆管癌组织中呈高表达,其高表达可能与胆管癌患者临床病理、不良预后密切相关。

[关键词] 胆管癌;核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3;临床病理;预后;生存率;影响因素
[中图法分类号] R657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)14-2454-05

Expression level of NLRP3 inflammasome in tissues of patients with cholangiocarcinoma and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis

YU Hebin,MENG Xiyun,GUO Yong[△]

(Department of Hepatobiliary Surgery,Changshou District People's Hospital,Chongqing 401220,China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression level of NLRP3 inflammasome in cholangiocarcinoma tissue and its relationship with the clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** The clinical data of 142 patients with cholangiocarcinoma treated by surgical resection and 40 patients with non- cholangiocarcinoma and normal bile duct epithelial tissue (control group) in the Changshou District People's Hospital from April 2016 to April 2018 were collected. The real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect NLRP3 inflammasome and caspase-1 mRNA levels in cholangiocarcinoma and control tissues. The levels of IL-1 β and IL-18 in supernatant were detected by ELISA. The univariate and multivariate Cox regression were used to analyze the independent factors affecting the survival and prognosis of the patients with cholangiocarcinoma. The Kaplan-Meier and Log-rank methods were used for conducting the prognostic analysis. **Results** Compared with the control group,the levels of NLRP3 inflammasome and caspase-1 mRNA,IL-1 β and IL-18 in the cholangiocarcinoma group were significantly increased ($P<0.05$). The high expression of NLRP3 inflammasome in the cholangiocarcinoma group was related to the TNM stage,tumor differentiation degree, lymph node metastasis and vascular invasion ($P<0.05$). The 3-year survival rate in the patients with NLRP3 inflammasome high expression was 25.86%(15/58),which was lower than 55.95%(47/84) in the patients with NLRP3 low expression,and the difference was statistically significant ($\chi^2=10.95,P<0.001$). The multivariate Cox regression analysis showed that the TNM stage,differentiation degree,lymph node metastasis

and NLRP3 inflammasome high expression were the independent factors affecting the survival and prognosis of the patients with cholangiocarcinoma ($P<0.05$). **Conclusion** NLRP3 inflammasome is highly expressed in cholangiocarcinoma tissues and its high expression may be closely related to the clinicopathology and poor prognosis of the patients with cholangiocarcinoma.

[Key words] cholangiocarcinoma; nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3; clinicopathology; prognosis; survival rate; influencing factor

胆管癌是起源于胆管上皮的恶性肿瘤,可累及肝内、肝门及远端胆管树。目前,胆管癌是仅次于肝细胞癌的第二大常见肝脏恶性肿瘤,其发病率和死亡率呈逐年上升趋势,特别是大多数患者就诊时已为中晚期,5 年生存率不足 30%^[1]。近年来研究显示,由免疫细胞触发的炎症与肿瘤形成、病情进展及预后密切相关^[2]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体是驱动机体免疫炎症反应的主要机制,可激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine aspartate specific proteinase-1, caspase-1), 活化的 caspase-1 可介导蛋白水解切割和促炎细胞因子白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的释放^[3]。目前已发现 NLRP3 炎性小体在炎症性疾病如糖尿病、动脉粥样硬化、肝癌等疾病中明显激活^[4-6],但目前在胆管癌研究较少。本研究通过检测胆管癌患者 NLRP3 炎性小体表达水平,探讨其与胆管癌患者临床病理特征及预后的关系,以期对胆管癌患者的临床治疗提供新的靶点和预后评估提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2016 年 4 月至 2018 年 4 月本院收治的行手术切除治疗的 142 例胆管癌患者的临床资料,其中男 82 例,女 60 例,年龄(59.4 $\pm$ 10.4)岁;TNM 分期:I 期 32 例,II 期 35 例,III 期 45 例,IV 期 30 例。纳入标准:(1)经术后病理确诊;(2)诊治满足胆管癌诊治指南^[7];(3)未接受过放化疗、生物治疗及相关手术治疗。排除标准:(1)存在其他胆系疾病;(2)各种急慢性感染;(3)近期使用过激素、免疫抑制剂;(4)存在其他部位恶性肿瘤。另选取 40 例正常胆管上皮组织作为对照,其中男 22 例,女 18 例,年龄(58.6 $\pm$ 10.8)岁。对照组与胆管癌组在性别、年龄等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院伦理委员会批准(AM201604102)并征得患者书面知情同意。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测相关基因 mRNA 水平

收集研究对象组织样本,采用 RNeasy Tissue Mini 试剂盒(美国 Qiagen 公司)提取总 RNA。逆转录试剂盒(上海生工公司)从 1 μ g 总的 RNA 中合成

逆转录 cDNA。Sybr-Green 和 CFX96 Thermal Cycler 进行实时 PCR 定量反应。反应条件及相关基因(NLRP3 和 caspase-1)引物参考既往文献[8],以 GAPDH 为内参,计算各组相应基因的相对表达量。

1.2.2 炎性细胞因子的检测

采用 ELISA 法测定组织上清液 IL-1 β 和 IL-18 水平,具体操作方法见武汉博士德生物公司提供的试剂盒说明书进行。

1.2.3 临床资料收集

收集患者临床病理资料,包括性别、年龄、TNM 分期、组织类型、肿瘤分化程度、是否发生淋巴结转移及有无脉管侵犯等。

1.2.4 随访

通过复诊、电话和微信等方式进行随访,随访 3 年,截止时间为 2021 年 4 月,记录患者生存状况,分析 NLRP3 炎性小体表达与患者预后的关系。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料以例数或率表示,采用 χ^2 检验;受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析曲线下面积(AUC)、最佳截断界值;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank 法比较生成率的差异;Cox 比例风险回归模型分析预后的独立影响因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 NLRP3 炎性小体及下游通路指标水平比较

与对照组比较,胆管癌组患者组织 NLRP3 炎性小体和 caspase-1 mRNA、IL-1 β 及 IL-18 水平明显升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组 NLRP3 炎性小体、caspase-1 mRNA 及相关炎性因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组 ($n=40$)	胆管癌组 ($n=142$)	t	P
NLRP3 炎性小体 mRNA	1.1 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.6	13.90	0.001
caspase-1 mRNA	1.0 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.5	18.06	0.001
IL-1 β (pg/mL)	15.6 $\pm$ 5.9	32.1 $\pm$ 7.3	13.13	0.001
IL-18(pg/mL)	19.3 $\pm$ 6.0	39.2 $\pm$ 8.4	14.00	0.001

2.2 NLRP3 炎性小体表达对患者长期生存状态的

预测能力

通过 ROC 曲线分析胆管癌患者 NLRP3 炎性小体表达水平对患者长期生存状态的预测能力,其 AUC 为 0.826(95%CI:0.766~0.887),确定 NLRP3 炎性小体的最佳截断界值为 2.61,见图 1。以 2.61 为界,将 142 例患者分为低表达组(84 例)和高表达组(58 例)。

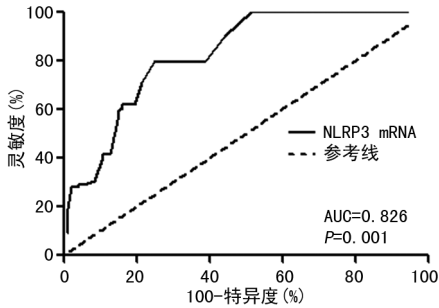


图 1 NLRP3 炎性小体表达预测患者生存状态 ROC 曲线

2.3 NLRP3 炎性小体表达与胆管癌患者临床病理关系

NLRP3 炎性小体表达与患者性别、年龄、组织类型等无关($P>0.05$),与 TNM 分期、肿瘤分化程度、淋巴结转移及脉管侵犯等有关($P<0.05$),见表 2。

2.4 NLRP3 炎性小体表达与胆管癌预后的关系

NLRP3 炎性小体高表达患者 3 年生存率 25.86%(15/58)低于 NLRP3 炎性小体低表达患者 55.95%(47/84),差异有统计学意义($\chi^2=10.95, P<0.001$),见图 2。

表 2 NLRP3 炎性小体表达与胆管癌患者临床病理关系[n(%)]					
临床病理	n	NLRP3 炎性小体		χ^2	P
		高表达 (n=58)	低表达 (n=84)		
性别				0.031	0.861
男	82	34(41.5)	48(58.5)		
女	60	24(40.0)	36(60.0)		
年龄				0.231	0.631
<60 岁	70	30(42.9)	40(57.1)		
≥60 岁	72	28(38.9)	44(61.1)		
TNM 分期				5.740	0.017
I~II 期	90	30(33.3)	60(66.7)		
III~IV 期	52	28(53.8)	24(46.2)		
组织类型				2.212	0.127
腺癌	98	36(36.7)	62(63.3)		
鳞癌	44	22(50.0)	22(50.0)		
分化程度				5.133	0.024
中低分化	87	42(48.3)	45(51.7)		
高分化	55	16(29.1)	39(70.9)		

续表 2 NLRP3 炎性小体表达与胆管癌患者临床病理关系[n(%)]

临床病理	n	NLRP3 炎性小体		χ^2	P
		高表达 (n=58)	低表达 (n=84)		
淋巴结转移				13.602	0.001
有	79	43(54.4)	36(45.6)		
无	63	15(23.8)	48(76.2)		
脉管侵犯				26.461	0.001
有	81	48(59.3)	33(40.7)		
无	61	10(16.4)	51(83.6)		

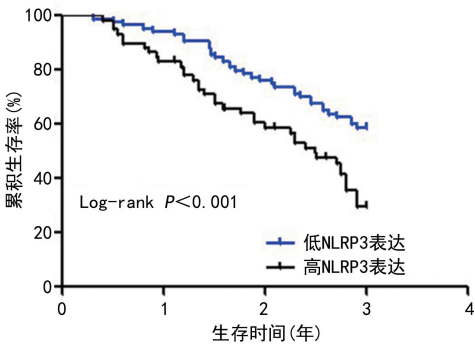


图 2 Kaplan-Meier 生存曲线比较

2.5 胆管癌患者预后的单因素和多因素 Cox 回归分析

单因素分析显示,TNM 分期、分化程度、淋巴结转移、脉管侵犯及 NLRP3 炎性小体高表达与胆管癌患者的生存预后相关($P<0.05$),见表 3。多因素 Cox 回归分析显示,TNM 分期、分化程度、淋巴结转移及 NLRP3 炎性小体高表达是影响胆管癌患者生存预后的独立因素($P<0.05$),见表 4。

表 3 胆管癌临床病理特征与预后的关系[n(%)]					
临床病理	n	生存 (n=62)	死亡 (n=80)	χ^2	P
性别				0.168	0.682
男	82	37(45.1)	45(54.9)		
女	60	25(41.7)	35(58.3)		
年龄				0.236	0.627
<60 岁	70	32(45.7)	38(54.3)		
≥60 岁	72	30(41.7)	42(58.3)		
TNM 分期				9.345	0.002
I~II 期	90	48(53.3)	42(46.7)		
III~IV 期	52	14(26.9)	38(73.1)		
组织类型				0.006	0.938
腺癌	98	43(43.9)	55(56.1)		
鳞癌	44	19(43.2)	25(56.8)		
分化程度				5.888	0.015

续表 3 胆管癌临床病理特征与预后的关系[n(%)]

临床病理	n	生存 (n=62)	死亡 (n=80)	χ ²	P
中低分化	87	31(35.6)	56(64.4)	6.512	0.011
高分化	55	31(56.4)	24(43.6)		
淋巴结转移				6.340	0.012
有	79	27(34.2)	52(65.8)		
无	63	35(55.6)	28(44.4)	8.210	0.004
脉管侵犯					
有	81	28(34.6)	53(65.4)	8.210	0.004
无	61	34(55.7)	27(44.3)		
NLRP3 炎性小体				8.210	0.004
高表达	58	17(29.3)	41(70.7)		
低表达	84	45(53.6)	39(46.4)		

表 4 Cox 多因素回归分析胆管癌生存预后的影响因素

自变量	β	SE	Wald	P	HR	95%CI
TNM 分期	1.445	0.429	4.235	0.028	2.132	1.215~9.353
分化程度	0.582	0.579	4.895	0.015	1.642	1.019~6.924
淋巴结转移	0.448	0.463	5.371	0.029	1.535	1.038~4.985
NLRP3 炎性小体表达	0.357	0.375	6.145	0.010	1.463	1.054~3.874

3 讨 论

胆管癌是一种预后较差的恶性肿瘤,有报道显示,即使经过根治性肝切除术,其 5 年总生存率也不足 30%,其主要原因在于术后复发率高,同时缺乏全身有效的治疗方案^[9]。因此,探寻有效的评估患者病情及预后的分子指标,对于指导胆管癌的治疗和改善预后,具有重要的临床价值。

既往研究显示,持续的炎症反应与恶性肿瘤的发生、发展密切相关^[10]。NLRP3 炎性小体是炎症反应激活的重要通路之一,其广泛表达于肿瘤组织和非肿瘤组织中,其激活有赖于 Toll 样受体磷酸化,随后激活核因子-κB(NF-κB)^[11]。相关研究显示,NLRP3 炎性小体除了参与恶性肿瘤的发生、发展以外,还与糖尿病、动脉粥样硬化等疾病的发生及进展相关,其可作为影响患者病情严重程度及预后的独立危险因素,同时也可能是上述炎症性疾病潜在的治疗靶点^[4-5]。有研究报道,NLRP3 炎性小体在正常组织中的表达水平较低,但在早期胚胎和恶性肿瘤中呈现高表达,表明 NLRP3 炎性小体除了炎症反应外,还可能在高等真核生物生长和恶性肿瘤细胞的增殖和分化方面,发挥重要作用^[12]。本研究结果显示,胆管癌组织 NLRP3 炎性小体及相关下游通路指标表达水平明显高于对照组,提示 NLRP3 炎性小体可能参与了胆管癌

的发生过程,这与相关 NLRP3 炎性小体在肝癌中的研究结果一致。

NLRP3 炎性小体相关通路的激活可能参与多种肿瘤的发生及进展^[13]。前期有研究发现,乳腺癌患者及动物模型中 NLRP3 炎性小体表达水平明显上调,并且其高表达与乳腺癌转移和生存期相关^[14]。其机制主要是 NLRP3 炎性小体激活下游 IL-1β,调控基质金属蛋白酶 1(MMP1)、MMP3 和 MMP10 的表达,同时 IL-1β 可激活 NF-κB 相关信号,招募单核细胞进入肿瘤局部微环境,促进肿瘤细胞侵袭和转移^[15]。而敲除或干扰 NLRP3 炎性小体表达,可明显抑制肿瘤细胞的增殖和转移,通过抑制 NLRP3 炎性小体相关通路,可能成为乳腺癌治疗的重要靶点^[16]。NLRP3 炎性小体还可介导 IL-18 的分泌,通过以下途径抑制肿瘤的发生及发展^[17]:(1)诱导和增强 NK 细胞对小鼠肝脏及结肠肿瘤细胞的杀伤活性;(2)促进 IL-22 结合蛋白的下调,从而抑制转录因子 STAT3 的过度活化和抗凋亡及增殖相关分子的表达。本研究结果发现,NLRP3 炎性小体表达与胆管癌临床病理分期、淋巴结转移、分化程度和脉管侵犯有关,表明 NLRP3 炎性小体可能在胆管癌的发生和发展中发挥重要的生物学作用。进一步研究发现,NLRP3 炎性小体与胆管癌患者临床预后有关,NLRP3 炎性小体高表达的胆管癌患者总生存率较低,多因素 Cox 回归分析显示,NLRP3 炎性小体高表达是影响胆管癌患者生存预后的独立因素。

综上所述,NLRP3 炎性小体在胆管癌患者中呈高表达,其可能与促进胆管癌的病理进程及多项临床病理特征相关,高表达 NLRP3 炎性小体预示更差的临床预后和更短的生存期。通过干预 NLRP3 炎性小体,有望成为胆管癌的潜在治疗靶点,但具体作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

[1] BERTUCCIO P, MALVEZZI M, CARIOLI G, et al. Global trends in mortality from intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. J Hepatol, 2019, 71(1):104-114.

[2] MASETTI R, TIRI A, TIGNANELLI A, et al. Autoimmunity and cancer [J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(9):102882.

[3] CHEN M Y, YE X J, HE X H, et al. The signaling pathways regulating NLRP3 inflammatory activation[J]. Inflammation, 2021, 44(4): 1229-1245.

- [4] GORA I M, CIECHANOWSKA A, LADYZYNSKI P. NLRP3 inflammasome at the interface of inflammation, endothelial dysfunction, and type 2 diabetes[J]. *Cells*, 2021, 10(2):314.
- [5] 武亚琳, 梁斌, 杨志明. NLRP3/IL-1 β 途径的促动脉粥样硬化作用及临床应用[J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(6):943-946.
- [6] 陈维, 魏涛, 杨岚, 等. 原发性肝癌患者癌组织 NLRP3 炎性小体表达状况研究[J]. *实用肝脏病杂志*, 2021, 24(4):544-547.
- [7] VALLE J W, BORBATH I, KHAN S A, et al. Biliary cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(Suppl 5):v28-v37.
- [8] 苏诗涵, 娄方丽. 急性缺血性脑卒中患者外周血 NLRP3 炎性小体表达变化及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(11):1299-1302, 1307.
- [9] VAN KEULEN A M, FRANSSEN S, VAN DER GEEST L G, et al. Nationwide treatment and outcomes of perihilar cholangiocarcinoma [J]. *Liver Int*, 2021, 41(8):1945-1953.
- [10] KOLIARAKI V, PRADOS A, ARMAKA M, et al. The mesenchymal context in inflammation, immunity and cancer[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(9):974-982.
- [11] YABUTA S, SHIDOJI Y. TLR4-mediated pyroptosis in human hepatoma-derived HuH-7 cells induced by a branched-chain polyunsaturated fatty acid, geranylgeranoic acid[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(4):BSR20194118.
- [12] SHAO X, LEI Z, ZHOU C. NLRP3 promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis via regulating epithelial mesenchymal transformation[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(7):820-827.
- [13] JU M, BI J, WEI Q, et al. Pan-cancer analysis of NLRP3 inflammasome with potential implications in prognosis and immunotherapy in human cancer[J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(4):bbaa345.
- [14] ERSHAID N, SHARON Y, DORON H, et al. NLRP3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4375.
- [15] TAN Y F, WANG M, CHEN Z Y, et al. Inhibition of BRD4 prevents proliferation and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma via NLRP3 inflammasome-induced pyroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4):239.
- [16] FARIA S S, COSTANTINI S, DE LIMA V C C, et al. NLRP3 inflammasome-mediated cytokine production and pyroptosis cell death in breast cancer[J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1):26.
- [17] SWANSON K V, DENG M, TING J P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(8):477-489.

(收稿日期:2021-10-18 修回日期:2022-02-26)

(上接第 2453 页)

- [18] CARDAILLAC C, PLOTEAU S, LE THUAUT A, et al. Ropivacaine 75 mg versus placebo in perineal infiltration for analgesic efficacy at mid- and long-term for episiotomy repair in postpartum women-the ROPISIO study: a two-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trials [J]. *Trials*, 2020, 21(1):522.
- [19] NORDIN P, ZETTERSTROM H, GUNNARSSON U, et al. Local, regional, or general anaesthesia in groin hernia repair: multicentre randomised trial[J]. *Lancet*, 2003, 362(9387):853-858.
- [20] CHOU D, ABALOS E, GYTE G M, et al. Paracetamol/acetaminophen (single administration) for perineal pain in the early postpartum period[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(3):CD008407.
- [21] CHANG S R, CHEN K H, LEE C N, et al. Relationships between perineal pain and postpartum depressive symptoms: a prospective cohort study[J]. *Int J Nurs Stud*, 2016, 59:68-78.

(收稿日期:2021-10-18 修回日期:2022-03-16)