文章编号:1000-5404(2014)16-1713-07

论著

# 痛风性关节炎患者NLRP3炎性体基因转录剪接体mRNA表达与临床检测指标的相关分析

党万太[1,2],谢文光[2],赵明才[2],蔡 燕[2],李玲琴[2],周 畅[2],周京国[2] (610075 成都,成都中医药大学临床医学院中西医结合系[1];637000 四川 南充,川北医学院附属医院风湿免疫研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨痛风性关节炎(gouty arthritis,GA)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing, NLRP3)炎性体基因及其转录剪接体的改变与GA患者临床实验指标的关系。**方法** 用半定量聚合酶链反应RT-PCR检测44例急性痛风性关节炎(acute gouty arthritis, AGA)患者、52例非急性痛风性关节炎(non-acute gouty arthritis,NAGA)患者和50名健康体检(healthy control, HC)者PBMCs中NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白[PYRIN-PAAD-DAPIN domain (PYD) and a C-terminal caspase recruitment domain (CARD), PYCARD]、半胱天冬酶1(caspase 1, CASP1)基因及其转录剪接体mRNA表达水平;检测AGA、NAGA患者与HC血常规、肝肾功能、血脂指标,比较上述3组指标的差异并分析NLRP3炎性体各基因及其转录剪接体mRNA表达与各指标的相关性。**结果** NAGA组NLRP3 mRNA表达量显著低于HC组与AGA组($P<0.05$),AGA组、NAGA组NLRP3-2、3、4 mRNA表达量均显著高于HC组($P<0.05$);AGA组、NAGA组PYCARD、PYCARD-1、PYCARD-2 mRNA表达量均显著高于HC组($P<0.05$);AGA组CASP1 mRNA表达量显著高于HC组与NAGA组($P<0.05$),AGA组CASP1-6 mRNA表达量显著低于HC组($P<0.05$),NAGA组CASP1-7 mRNA表达量显著低于HC组($P<0.05$),AGA组CASP1-gamma mRNA表达量显著高于HC组与NAGA组($P<0.05$)。AGA组、NAGA组血常规、肝肾功能、血脂指标与HC组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);相关性分析显示NLRP3炎性体部分基因及其转录剪接体mRNA表达与AGA组、NAGA组部分临床实验指标具有相关性($P<0.05$),与HC组临床实验指标均未见相关性($P>0.05$)。**结论** NLRP3炎性体基因转录剪接体mRNA在GA患者中表达异常,提示在GA患者的炎症反应中NLRP3炎性体基因转录剪接体可能发挥重要的调控作用;GA患者临床实验指标与HC组比较存在差异,且NLRP3炎性体部分基因及其转录剪接体与GA患者部分临床实验指标具有相关性。

[关键词] 痛风性关节炎;NLRP3;炎性体;基因;转录剪接体
[中图法分类号] R392.13;R446.6;R589.7 [文献标志码] A

# Correlation analysis of expression of NLRP3 gene transcript variant mRNA and clinical examination indexes in patients with gouty arthritis

Dang Wantai[1,2], Xie Wenguang[2], Zhao Mingcai[2], Cai Yan[2], Li Lingqin[2], Zhou Chang[2], Zhou Jingguo[2] ([1]Department of Integrated Chinese and Western Medicines, School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan Province, 610075; [2]Institute of Rheumatology and Immunology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Province, Nanchong 637000, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between the expression level of NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome gene transcript variant mRNA and the clinical examination indexes of patients with gouty arthritis (GA). **Methods** NLRP3, PYRIN-PAAD-DAPIN domain and a C-terminal caspase recruitment domain (PYCARD) and caspase 1 (CASP1) mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of NLRP3, PYCARD and CASP1 gene mRNA in PBMCs was compared between the patients with acute gouty arthritis (AGA) ($n=44$), the patients with non-acute gouty arthritis (NAGA)

[基金项目] 国家自然科学基金(81272047);国家自然科学基金(81070174);四川省教育厅基金(12ZA046)
[通信作者] 周京国,E-mail:jgzhou@nsmc.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140618.1742.003.html(2014-06-18)

($n=52$) and healthy controls (HCs) ($n=50$), with β-actin as internal control. Routine blood analysis, blood biochemistry, and blood lipid indexes were measured using a routine blood analyzer and a blood biochemistry analyzer to analyze the correlation between the mRNA expression of NLRP3 inflammasome gene transcript variant and each clinical index. **Results** The mRNA expression of NLRP3 was significantly lower in the HCs and the AGA patients than in the NAGA patients ($P<0.05$). The mRNA expression of NLRP3-2, NLRP3-3, and NLRP3-4 increased significantly in the patients with AGA and NAGA as compared to the HCs ($P<0.05$). The mRNA expression of PYCARD, PYCARD-1, and PYCARD-2 increased significantly in the AGA and NAGA patients as compared to the HCs ($P<0.05$). The mRNA expression of CASP1 increased significantly in the AGA patients as compared to the HCs and the NAGA patients ($P<0.05$). The mRNA expression of CASP1-6 was significantly lower in the AGA patients as compared to the HCs ($P<0.05$). The mRNA expression of CASP1-7 were significantly lower in the NAGA patients compared to the HCs ($P<0.05$). The mRNA expression of CASP1-gamma increased significantly in the AGA patients as compared to the HCs and NAGA patients ($P<0.05$). There were statistically significant differences of each clinical index between the AGA and NAGA patients and the HCs ($P<0.05$). A positive correlation was found between the mRNA expression of NLRP3 inflammasome gene transcript variant and the clinical indexes in the AGA and NAGA patients ($P<0.05$), but not in the HCs ($P>0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of the NLRP3 inflammasome gene and transcript variant mRNA in GA shows that the gene of NLRP3 inflammasome and its transcript variant may play a regulatory role in the inflammatory reaction. The correlation between the gene of NLRP3 inflammasome and its transcript variant and the clinical examination indexes of GA indicates the potential application in clinical diagnosis and treatment of GA.

[**Key words**] gouty arthritis; NLRP3; inflammasome; gene; transcript variant

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81272047, 81070174) and the Project of Education Department of Sichuan Province (12ZA046). Corresponding author: Zhou Jingguo, E-mail: jgzhou@nsmc.edu.cn

痛风(gout)是一种单钠尿酸盐(monosodium urate, MSU)晶体沉积所致的晶体相关性关节病,与嘌呤代谢紊乱及(或)尿酸排泄减少所致的高尿酸血症直接相关,属于代谢性风湿病的范畴[1]。研究发现除代谢因素外,免疫与炎症也参与痛风的发病,尤其是固有免疫(innate immunity)在痛风急性炎症发生、发展的过程中发挥着重要作用[2-3]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing, NLRP3)是NOD样受体(NOD like receptor, NLR)亚族的重要成员,当NLRP3与PYCARD及CASP1活化形成NLRP3炎性体后参与IL-1β和IL-18的加工、分泌,诱导细胞炎症或凋亡[2]。基因的选择性剪接是生物体内一种基本且重要的调控机制,在机体发育、组织特异性表达、疾病发生和发展等方面发挥重要的作用[4]。然而,NLRP3炎性体基因转录剪接体在痛风中的研究目前国内外尚少见文献报道,本研究拟通过RT-PCR检测痛风性关节炎(gouty arthritis, GA)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中NLRP3炎性体基因及其转录剪接体(transcript variant)mRNA的表达,并结合相关临床实验指标进行分析,探讨NLRP3炎性体基因及其转录剪接体mRNA表达与GA患者临床实验指标的关系及其在GA患者炎症反应中的作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

1.1.1 一般资料 应用1977年美国风湿病协会(ACR)诊断标准[5],排除肾脏、心血管、血液疾病引起的继发性痛风,排除合并感染或自身免疫性疾病者。收集2012年9月至2013年8月川北医学院附属医院风湿门诊和住院的44例AGA与52例NAGA患者,所有患者均为男性,年龄25~78(43±13)岁,病程1~21(8±4)年。HC组为50名同期在川北医学院附属医院体检的健康男性,年龄22~65(42±9)岁,入选者实验室指标均无异常且无心血管系统疾病、糖尿病、肝脏疾病及痛风等病史及家族史,并排除感染及自身免疫性疾病[3]。两组人群年龄差异无统计学意义。该试验通过当地伦理委员会的同意与支持,所有参与者均签订知情同意书。

1.1.2 主要试剂与仪器 人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司),TRIzol试剂(Invitrogen公司),PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real-time)试剂盒(日本TaKaRa公司),D2000 DNA Marker(天根生化科技北京有限公司),TaKaRa LA *Taq*试剂盒(日本TaKaRa公司),琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司),GreenView核酸

染料(成都博瑞克生物技术有限公司),低温高速离心机 5417R(Eppendorf 公司,USA), FlexCycler PCR 仪(德国耶拿分析仪器股份公司,德国),FUSION-Fx5 曝光机(北京五洲东方科技发展有限公司),XE-5000 全自动血液分析仪(日本希森美康株式会社),日立 7600-020 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术)[3]。

1.1.3 引物设计 依据 GenBank 中人肌动蛋白(β-actin)、NLRP3 炎性体基因及其转录剪接体设计引物用于 RT-PCR 检测,PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,NLRP3 炎性体 3 个基因相关信息见表 1,所设计各引物序列见表 2。

**表 1 NLRP3 炎性体 3 个基因的相关信息**

| 基因名称 | 基因 ID | 基因定位 | 外显子 | 内含子 | 转录剪接体 | 功能结构域 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NLRP3 | 114548 | 1q44 | 10 | 9 | 6 | 4 |
| PYCARD | 29108 | 16p11.2 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| CASP1 | 834 | 11q23 | 10 | 9 | 7 | 2 |

## 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与 cDNA 的制备 取外周静脉血 2.5 mL,用肝素钠抗凝。用人淋巴细胞分离液(Ficoll)无菌分离 PBMCs,用 TRIzol 试剂,严格按照说明书操作提取总 RNA,加入 30 μL 无 RNA 酶水溶解 RNA[3]。取 5 μL RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳,在 1.5% 琼脂糖凝胶图谱中显示 28S、18S、5S 三条带(图 1L)。紫外分光光度计检测 RNA 在 260、280nm 波长处的光密度值,并计算 $D_{260}/D_{280}$ 比值(采用 1.8 ~ 2.0 者)。cDNA 的合成严格按照逆转录试剂盒说明书操作,条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s 终止反应。60 μL 的逆转录体系如下:5 × *g* DNA Eraser Buffer 6 μL,gDNA Eraser 3 μL,Total RNA 5 μL,5 × PrimeScript Buffer2(for Real-time)12 μL,PrimeScript RT Enzyme Mix Ⅰ3 μL,RT Primer Mix 3 μL,RNase Free $dH_2O$ 28 μL[3]。将产物 cDNA 冻存于 -20 ℃备用。

1.2.2 NLRP3 炎性体各基因及转录剪接体 PCR 检测 以健康体检者与 GA 患者的 cDNA 建立 25 μL 的反应体系进行 PCR 扩增:TaKaRa LA *Taq*(5 U/μL) 0.25 μL,10 × LA PCR Buffer Ⅱ($Mg^{2+}$ Free) 2.5 μL,$MgCl_2$(25 mmol/L)2.5 μL,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μL,模板 DNA(cDNA)1 μL,上游引物(20 μmol/L)0.5 μL,下游引物(20 μmol/L)0.5 μL,灭菌蒸馏水 13.75 μL。反应条件为 95 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s(此温度依据各个引物所要求的温度来设计)、72 ℃ 1 min 共 35 个循环,72 ℃延伸 5 min。 -20 ℃保存。将扩增产物用 1% ~ 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测(琼脂糖凝胶中加入 GreenView 核酸染料),后将琼脂糖凝胶用 FUSION-Fx5 曝光机进行曝光拍摄。将曝光后获得的 PCR 目的条带图像用 Quantity-One(Bio-Rad)软件进行灰度值测定,以目的灰度值比内参灰度值来表示目的基因 mRNA 表达量的高低[3]。

1.2.3 PCR 产物纯化、测序 PCR 产物经凝胶电泳后用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒进行纯化,回收目的基因片段,并将回收的目的基因重新进行凝胶电泳分析,确认有条带后将纯化的目的基因片段送南京金斯瑞生物科技有限公司进行核酸序列测定。

1.2.4 收集临床实验指标及检测方法 所有受试者禁食 12 h,于清晨采集肘静脉血,用 XE-5000 全自动血液分析仪检测:白细胞计数(WBC)、嗜中性粒细胞绝对值(GR)、淋巴细胞绝对值(LY)、单核细胞绝对值(MO);用日立 7600-020 全自动生化分析仪检测肝、肾功能:丙氨酸氨基移换酶(ALT)、门冬氨酸氨基移换酶(AST)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLOB)、血尿酸(UA)、尿素(Ur)、肌酐(Cr);分别采用磷酸甘油氧化酶-过氧化酶法、胆固醇酯酶-胆固醇氧化酶法、清除法(一步法)测定甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)浓度,按照 Friedwald 公式[LDL-c = TC-(HDL-c + TG/2.2)]计算低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)浓度,按照 Friedwald 公式(VLDL-c = 0.2 × TG)计算极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-c),载脂蛋白 A1(apoA)、载脂蛋白 B100(apoB100)浓度测定采用透射免疫浊度法。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件,各组实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),各组间的相关分析采用 Spearman 相关分析。

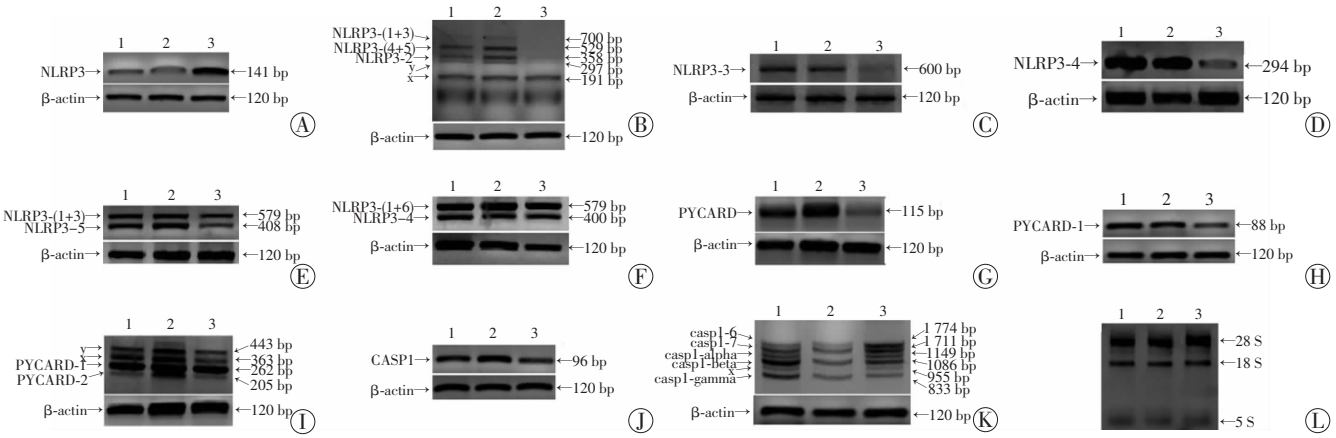
# 2 结果

## 2.1 各组 NLRP3 炎性体基因及其转录剪接体电泳及测序结果

NLRP3 炎性体基因及其转录剪接体电泳及测序结果见图 1。

**表 2 NLRP3 炎性体基因及其转录剪接体引物序列**

| 基因名称 | 上游 | 下游 | 片段大小 |
|---|---|---|---|
| NLRP3 | 5′-CCCCGTGAGTCCCATTA-3′ | 5′-GACGCCCAGTCCAACAT-3′ | 141 bp |
| NLRP3-2 | 5′-ATGCCCAAGGAGGAAGAGG-3′ | 5′-GCAGGTAAAGGTGCGTGAGAT-3′ | 358 bp |
| NLRP3-3 | 5′-CTGGCATCTGGGGAAACCTT-3′ | 5′-GCTCACACTCTCACCCAGAC-3′ | 600 bp |
| NLRP3-4 | 5′-AGTTAGCCAAATGCTTACCA-3′ | 5′-GCATTTCCTCTCTAGCTGTTC-3′ | 294 bp |
| NLRP3-5 | 5′-ATTGAGAACTGTCATCGGGTG-3′ | 5′-CACATAGAGTCTGGTCAGGGAAT-3′ | 408 bp |
| NLRP3-1 +6 | 5′-ATTGAGAACTGTCATCGGGTG-3′ | 5′-CACATAGAGTCTGGTCAGGGA-3′ | 579 bp |
| PYCARD | 5′-GATGCTCTGTACGGGAAGGTC-3′ | 5′-TCCAGTTCCAGGCTGGTGT-3′ | 115 bp |
| PYCARD-1 | 5′-ATCCAGGCCCCTCCTCAGTC-3′ | 5′-CGTTTGTGACCCTCGCGATA-3′ | 88 bp |
| PYCARD-2 | 5′-TGGACGCCTTGGACCTCAC-3′ | 5′-TCCAGCAGCCACTCAACG-3′ | 205 bp |
| CASP1 | 5′-CGCAGATGCCCACCACT-3′ | 5′-TGCCCACAGACATTCATACAG-3′ | 96 bp |
| CASP1-6 | 5′-TACAGTTATGGATAAGACCCGAGC-3′ | 5′-GCAGACATAATTCCAAAAACCTTTA-3′ | 1 774 bp |
| CASP1-7 | 5′-TACAGTTATGGATAAGACCCGAGC-3′ | 5′-GCAGACATAATTCCAAAAACCTTTA-3′ | 1 711 bp |
| CASP1-beta | 5′-TACAGTTATGGATAAGACCCGAGC-3′ | 5′-GCAGACATAATTCCAAAAACCTTTA-3′ | 1 086 bp |
| CASP1-alpha | 5′-TACAGTTATGGATAAGACCCGAGC-3′ | 5′-GCAGACATAATTCCAAAAACCTTTA-3′ | 1 149 bp |
| CASP1-gamma | 5′-TACAGTTATGGATAAGACCCGAGC-3′ | 5′-GCAGACATAATTCCAAAAACCTTTA-3′ | 833 bp |
| b-actin | 5′-GTAGTTTCGTGGATGCCACAG-3′ | 5′-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3′ | 120 bp |




A～F:依次为NLRP3基因及其转录剪接体mRNA表达;A:NLRP3 mRNA表达;B:NLRP3-2 mRNA表达,NLRP3-2引物同时还可以扩出x与y 2条未知带;C:NLRP3-3 mRNA表达;D:NLRP3-4 mRNA表达;E:NLRP3-5 mRNA表达;F:NLRP3-1+6 mRNA表达;G～I:分别为PYCARD基因及其转录剪接体mRNA表达;G:PYCARD mRNA表达;H:PYCARD-1 mRNA表达;I:PYCARD-2 mRNA表达,PYCARD-2引物同时还可以扩出x与y 2条未知带;J、K为CASP1基因及其转录剪接体的mRNA表达;J:CASP1 mRNA表达;K:CASP1(6、7、alpha、beta、gamma) mRNA表达,该引物同时还可以扩出1条未知条带x;L:PBMCs RNA质量电泳结果;1:AGA组;2:NAGA组;3:HC组

**图1 各组研究对象PBMCs的NLRP3炎性体基因及其转录剪接体mRNA表达及RNA质量电泳结果**

**表3 各组研究对象PBMCs的NLRP3基因及其转录剪接体mRNA相对表达量** ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | NLRP3 | NLRP3-2 | NLRP3-3 | NLRP3-4 | NLRP3-5 | NLRP3-1+6 | PYCARD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HC组 | 50 | 91.36±44.23 | 47.68±41.97 | 29.02±22.38 | 33.36±25.11 | 68.54±44.89 | 69.76±46.83 | 46.25±34.23 |
| AGA组 | 44 | 80.49±31.24 | 82.68±35.90[a] | 102.63±29.49[a] | 89.47±33.53[a] | 74.00±47.09 | 67.40±41.11 | 89.73±34.25[a] |
| NAGA组 | 52 | 46.81±29.12[ac] | 90.55±35.81[a] | 91.61±29.38[a] | 98.57±33.01[a] | 77.84±35.13 | 82.35±37.79 | 81.30±41.56[a] |

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与HC组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与AGA组比较

**表4 各组研究对象PBMCs的PYCARD基因及其转录剪接体mRNA相对表达量** ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | *P*YCARD-1 | *P*YCARD-2 | CASP1 | CASP1-6 | CASP1-7 | CASP1-beta | CASP1-alpha | CASP1-gamma |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HC组 | 50 | 34.92±28.86 | 52.62±45.10 | 51.43±33.04 | 81.88±42.60 | 80.22±43.89 | 67.58±45.13 | 70.86±40.50 | 65.36±44.04 |
| AGA组 | 44 | 92.75±35.39[a] | 87.15±34.69[a] | 100.29±20.14[a] | 65.25±39.98[a] | 77.63±40.30 | 74.84±41.44 | 74.43±43.77 | 87.25±43.22[a] |
| NAGA组 | 52 | 94.30±31.74[a] | 82.01±38.11[a] | 56.29±20.35[c] | 72.42±43.17 | 63.53±41.27[a] | 78.05±40.28 | 75.25±43.38 | 69.69±37.45[c] |

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与HC组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与AGA组比较

### 2.2 NLRP3炎性体基因及其转录剪接体mRNA在各组PBMCs中的表达

结果见表3、4。NAGA组NLRP3 mRNA表达量显著低于HC组与AGA组($P<0.05$),AGA组、NAGA组NLRP3-2、3、4 mRNA表达量均显著高于HC组($P<0.05$),AGA组、NAGA组NLRP3-5、NLRP3-1+6 mRNA表达与HC组比较差异无统计学意义($P>0.05$);AGA组、NAGA组PYCARD、PYCARD-1、PYCARD-2 mRNA表达量均显著高于HC组($P<0.05$);AGA组CASP1 mRNA表达量显著高于HC组与NAGA组($P<0.05$),AGA组CASP1-6 mRNA表达量显著低于HC组($P<0.05$),NAGA组CASP1-7 mRNA表达量显著低于HC组($P<0.05$),AGA组CASP1-gamma mRNA表达量显著高于HC组与NAGA组($P<0.05$),AGA组、NAGA组CASP1-beta、CASP1-alpha mRNA表达与HC组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

### 2.3 AGA、NAGA组与HC组临床实验指标比较

结果见表5～7。AGA组血常规(WBC、GR、LY、MO)、肝、肾功能(ALT、AST、ALB、GLOB、UA、Cr、Ur)、血脂(TG、VLDL-c、apoA、apoB100)指标均显著高于HC组($P<0.05$),AGA组HDL-c水平显著低于HC组($P<0.05$);NAGA组(WBC)、肝、肾功能(ALT、AST、GLOB、Ur、UA、Cr)、血脂(TG、TC、VLDL-C)指标均显著高于HC组($P<0.05$),AGA组、NAGA组LDL-c水平均显著低于HC组,NAGA组MO显著低于AGA组($P<0.05$),NAGA组TG、TC、VLDL-c均显著高于AGA组($P<0.05$)。

### 2.4 NLRP3炎性体基因及其转录剪接体mRNA表达与各组临床实验指标的相关性分析

2.4.1 与AGA组临床实验指标的相关性分析 结果见表8。AGA组WBC与NLRP3、NLRP3-2、NLRP3-5、PYCARD、PYCARD-1、PYCARD-2、CASP1-6、CASP1-7、CASP1-beta、CASP1-alpha、CASP1-gamma mRNA表达均呈正相关($P<0.05$);GR与NLRP3、NLRP3-2、NLRP3-5、PYCARD-1、PYCARD-2、CASP1-6、CASP1-7、CASP1-beta、CASP1-alpha、CASP1-gamma mRNA表达均呈正相关($P<0.05$);GLOB与NLRP3、NLRP3-3、NLRP3-1+6、PYCARD-2、CASP1-6、CASP1-7 mRNA表达均呈正相关($P<0.05$);AST与CASP1-alpha mRNA表达呈负相关($P<0.05$);ALB与NLRP3-1+6 mRNA表达呈负相关($P<0.05$);apoA与NLRP3-5 mRNA表达呈正相关($P<0.05$);apoA与NLRP3-1+6 mRNA表达呈负相关($P<0.05$);AGA组NLRP3炎性体基因

及其转录剪接体 mRNA 表达与 LY、MO、UA、Cr、Ur、ALT、TG、HDL-c、LDL-c、VLDL-c、apoB100 指标均未见相关性($P>0.05$)。

2.4.2 与 NAGA 组临床实验指标的相关性分析 结果见表 9。NAGA 组 WBC 与 CASP1-7 mRNA 表达呈正相关($P<0.05$);GR 与 PYCARD-2、CASP1-7 mRNA 表达均呈正相关($P<0.05$);MO 与 PYCARD、CASP1-beta mRNA 表达均呈正相关($P<0.05$);AST 与 CASP1-beta mRNA 表达呈负相关($P<0.05$);ALB 与 NLRP3、PYCARD-2、CASP1、CASP1-6、CASP1-7、mRNA 表达均呈正相关($P<0.05$);TC 与 PYCARD、CASP1 mRNA表达均呈负相关($P<0.05$);apoA 与 NLRP3-1 +6 mRNA 表达呈负相关($P<0.05$);NAGA 组 NLRP3 炎性体各基因及转录剪接体 mRNA 表达与 LY、ALT、GLOB 、UA、Cr、Ur、TG、HDL-C、LDL-C、VLDL-C、apoB100 指标均未见相关性($P>0.05$)。

**表 5 各组研究对象血常规部分检测指标比较** ($\times10^9$/L,$\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | WBC | GR | LY | MO |
|---|---|---|---|---|---|
| HC 组 | 50 | 5.43 ± 2.11 | 4.04 ± 1.32 | 1.30 ± 0.23 | 0.41 ± 0.15 |
| AGA 组 | 44 | 7.86 ± 2.01[b] | 5.17 ± 1.62[a] | 1.86 ± 0.65[a] | 0.63 ± 0.24[a] |
| NAGA 组 | 52 | 6.73 ± 2.67[a] | 4.10 ± 2.03 | 1.97 ± 0.55 | 0.50 ± 0.21[c] |

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 HC 组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与 AGA 组比较

**表 6 各组研究对象肝、肾功能检测指标比较** ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | ALT(U/L) | AST(U/L) | ALB(g/L) | GLOB(g/L) | UA(μmol/L) | Cr(μmol/L) | Ur(mmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HC 组 | 50 | 25.32 ± 10.12 | 17.22 ± 7.28 | 47.23 ± 1.99 | 22.15 ± 3.44 | 208.18 ± 78.91 | 62.27 ± 19.41 | 4.21 ± 1.23 |
| AGA 组 | 44 | 34.19 ± 14.34[b] | 30.12 ± 12.79[b] | 43.91 ± 4.33[a] | 31.23 ± 4.12[b] | 498.67 ± 149.68[b] | 79.43 ± 18.15[a] | 5.47 ± 1.11[a] |
| NAGA 组 | 52 | 30.77 ± 14.13[a] | 29.29 ± 11.77[b] | 45.56 ± 2.66 | 29.71 ± 3.81[a] | 468.33 ± 93.48[b] | 77.37 ± 17.23[a] | 5.84 ± 1.69[b] |

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 HC 组比较

**表 7 各组研究对象血脂水平比较** ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | TG(mmol/L) | TC(mmol/L) | HDL-c(mmol/L) | LDL-c(mmol/L) | VLDL-c(mmol/L) | apoA(g/L) | apoB100(g/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HC 组 | 50 | 1.02 ± 0.39 | 4.54 ± 0.48 | 1.37 ± 0.38 | 2.80 ± 0.68 | 0.78 ± 0.11 | 1.49 ± 0.15 | 0.94 ± 0.32 |
| AGA 组 | 44 | 2.17 ± 0.70[b] | 4.41 ± 1.03 | 1.05 ± 0.17[a] | 2.31 ± 0.88[b] | 1.16 ± 0.54[b] | 1.09 ± 0.17[a] | 0.80 ± 0.22[a] |
| NAGA 组 | 52 | 2.84 ± 1.16[b] | 4.95 ± 0.82[ad] | 1.17 ± 0.49 | 1.05 ± 0.51[b] | 1.48 ± 0.27[b] | 1.32 ± 0.30 | 0.91 ± 0.27 |

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 HC 组比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与 AGA 组比较

**表 8 AGA 组患者 NLRP3 炎性体基因及其转录剪接体 mRNA 表达与其各临床实验指标的相关性分析**

| 基因名称 | 统计值 | WBC | GR | AST | ALB | GLOB | TC | apoA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NLRP3 | $r$ | 0.344 | 0.357 | −0.048 | −0.281 | 0.321 | 0.025 | −0.034 |
| | $P$ | 0.022 | 0.017 | 0.756 | 0.064 | 0.034 | 0.873 | 0.825 |
| NLRP3-2 | $r$ | 0.408 | 0.410 | 0.017 | −0.002 | 0.127 | 0.083 | 0.080 |
| | $P$ | 0.006 | 0.006 | 0.915 | 0.991 | 0.411 | 0.593 | 0.606 |
| NLRP3-3 | $r$ | 0.249 | 0.242 | −0.115 | −0.229 | 0.321 | −0.179 | −0.086 |
| | $P$ | 0.103 | 0.113 | 0.459 | 0.135 | 0.033 | 0.246 | 0.579 |
| NLRP3-4 | $r$ | 0.295 | 0.290 | −0.269 | −0.201 | 0.104 | −0.071 | 0.039 |
| | $P$ | 0.052 | 0.056 | 0.077 | 0.191 | 0.501 | 0.649 | 0.801 |
| NLRP3-5 | $r$ | 0.461 | 0.440 | −0.151 | −0.122 | −0.063 | 0.281 | 0.344 |
| | $P$ | 0.002 | 0.003 | 0.329 | 0.429 | 0.685 | 0.065 | 0.022 |
| NLRP3-1 +6 | $r$ | 0.193 | 0.157 | −0.287 | −0.335 | 0.392 | −0.206 | −0.314 |
| | $P$ | 0.209 | 0.310 | 0.059 | 0.026 | 0.008 | 0.179 | 0.038 |
| PYCARD | $r$ | 0.341 | 0.290 | 0.026 | −0.026 | 0.084 | 0.060 | 0.011 |
| | $P$ | 0.023 | 0.056 | 0.865 | 0.865 | 0.586 | 0.697 | 0.941 |
| PYCARD-1 | $r$ | 0.389 | 0.340 | −0.149 | 0.011 | −0.064 | 0.127 | 0.213 |
| | $P$ | 0.009 | 0.024 | 0.334 | 0.942 | 0.679 | 0.413 | 0.165 |
| PYCARD-2 | $r$ | 0.356 | 0.361 | −0.097 | −0.069 | 0.369 | −0.081 | −0.005 |
| | $P$ | 0.018 | 0.016 | 0.532 | 0.657 | 0.014 | 0.603 | 0.974 |
| CASP1 | $r$ | 0.259 | 0.255 | 0.000 | −0.052 | 0.216 | −0.021 | 0.123 |
| | $P$ | 0.089 | 0.094 | 0.999 | 0.740 | 0.160 | 0.890 | 0.427 |
| CASP1-6 | $r$ | 0.313 | 0.312 | −0.127 | −0.152 | 0.346 | −0.073 | 0.014 |
| | $P$ | 0.039 | 0.039 | 0.411 | 0.324 | 0.021 | 0.636 | 0.929 |
| CASP1-7 | $r$ | 0.337 | 0.354 | −0.096 | −0.102 | 0.341 | −0.083 | 0.026 |
| | $P$ | 0.025 | 0.018 | 0.534 | 0.511 | 0.024 | 0.591 | 0.865 |
| CASP1-beta | $r$ | 0.333 | 0.326 | −0.275 | −0.112 | 0.210 | 0.123 | 0.016 |
| | $P$ | 0.027 | 0.031 | 0.071 | 0.469 | 0.172 | 0.426 | 0.919 |
| CASP1-alpha | $r$ | 0.302 | 0.300 | −0.330 | −0.102 | 0.180 | 0.037 | 0.046 |
| | $P$ | 0.046 | 0.048 | 0.029 | 0.509 | 0.243 | 0.810 | 0.769 |
| CASP1-gamma | $r$ | 0.337 | 0.385 | −0.104 | −0.062 | 0.253 | −0.117 | −0.029 |
| | $P$ | 0.025 | 0.010 | 0.502 | 0.687 | 0.097 | 0.451 | 0.851 |

**表9 NAGA组患者NLRP3炎性体各基因及转录剪接体与其各临床实验指标的相关性分析**

| 基因名称 | 统计值 | WBC | GR | MO | AST | ALB | TC | apoA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NLRP3 | *r* | 0.048 | −0.005 | −0.016 | −0.126 | 0.345 | −0.182 | −0.036 |
| | *P* | 0.756 | 0.974 | 0.919 | 0.415 | 0.022 | 0.197 | 0.815 |
| NLRP3-2 | *r* | 0.202 | 0.253 | 0.184 | −0.225 | 0.216 | −0.149 | −0.092 |
| | *P* | 0.189 | 0.097 | 0.231 | 0.143 | 0.159 | 0.292 | 0.553 |
| NLRP3-3 | *r* | 0.105 | 0.242 | 0.121 | −0.296 | 0.210 | −0.142 | −0.213 |
| | *P* | 0.498 | 0.114 | 0.434 | 0.051 | 0.172 | 0.314 | 0.166 |
| NLRP3-4 | *r* | 0.179 | 0.247 | −0.041 | −0.238 | 0.164 | −0.212 | −0.109 |
| | *P* | 0.245 | 0.105 | 0.791 | 0.120 | 0.287 | 0.131 | 0.483 |
| NLRP3-5 | *r* | 0.162 | 0.192 | 0.143 | −0.315 | 0.031 | 0.046 | −0.209 |
| | *P* | 0.293 | 0.212 | 0.355 | 0.037 | 0.844 | 0.745 | 0.174 |
| NLRP3-1 +6 | *r* | 0.140 | 0.107 | −0.091 | −0.202 | 0.168 | −0.099 | −0.383 |
| | *P* | 0.363 | 0.489 | 0.556 | 0.189 | 0.275 | 0.483 | 0.010 |
| PYCARD | *r* | 0.093 | 0.184 | 0.338 | −0.308 | −0.021 | −0.283 | −0.057 |
| | *P* | 0.547 | 0.231 | 0.025 | 0.042 | 0.894 | 0.042 | 0.711 |
| PYCARD-1 | *r* | 0.098 | 0.084 | −0.003 | −0.281 | −0.165 | −0.039 | −0.217 |
| | *P* | 0.529 | 0.588 | 0.982 | 0.065 | 0.284 | 0.786 | 0.157 |
| PYCARD-2 | *r* | 0.280 | 0.301 | 0.178 | −0.289 | 0.353 | −0.156 | −0.143 |
| | *P* | 0.066 | 0.047 | 0.247 | 0.057 | 0.019 | 0.270 | 0.356 |
| CASP1 | *r* | 0.160 | 0.045 | 0.032 | −0.063 | 0.385 | −0.291 | 0.064 |
| | *P* | 0.298 | 0.774 | 0.839 | 0.684 | 0.010 | 0.037 | 0.682 |
| CASP1-6 | *r* | 0.149 | 0.181 | 0.162 | −0.235 | 0.408 | −0.175 | −0.100 |
| | *P* | 0.334 | 0.241 | 0.295 | 0.125 | 0.006 | 0.215 | 0.516 |
| CASP1-7 | *r* | 0.355 | 0.398 | 0.149 | −0.262 | 0.345 | −0.074 | −0.218 |
| | *P* | 0.018 | 0.007 | 0.333 | 0.086 | 0.022 | 0.602 | 0.155 |
| CASP1-beta | *r* | 0.133 | 0.134 | 0.316 | −0.349 | 0.102 | −0.062 | −0.123 |
| | *P* | 0.390 | 0.385 | 0.037 | 0.020 | 0.510 | 0.664 | 0.427 |
| CASP1-alpha | *r* | 0.183 | 0.173 | 0.115 | −0.420 | 0.037 | −0.226 | −0.281 |
| | *P* | 0.234 | 0.262 | 0.456 | 0.005 | 0.811 | 0.107 | 0.065 |
| CASP1-gamma | *r* | 0.296 | 0.261 | 0.123 | −0.291 | 0.116 | −0.160 | −0.120 |
| | *P* | 0.051 | 0.088 | 0.428 | 0.055 | 0.453 | 0.258 | 0.436 |

2.4.3 与HC组临床实验指标的相关性分析 NLRP3炎性体各基因及转录剪接体mRNA表达与HC组临床实验指标相关性均不显著($P>0.05$)。

## 3 讨论

从基因水平上明确痛风的发生、发展并寻求治疗手段,成为近年的研究热点,选择性剪接或可变剪接在机体发育、组织特异性表达、疾病发生和发展等方面起重要作用,是生物体内一种基本且重要的调控机制,已有研究显示基因功能多态性可能与基因选择性剪接等转录后的调控有关[6-7]。一个mRNA前体(pre-mRNA)通过选择不同的剪接位点组合产生不同的mRNA剪接变异体(Splice variant)[8-10]。

研究发现NLRP3炎性体在痛风的发病过程具有一定的作用[11]。NLRP3炎性体主要参与IL-1β的活化[12],使活化的成熟IL-1β分泌到胞外[13],产生炎症和免疫反应[14-15]。本研究发现NLRP3炎性体各基因转录剪接体除CASP1基因的delta与epsilon转录剪接体未见外(CASP1-delta与CASP1-epsilon基因转录剪接体我们正在从不同的研究群体中进一步研究),其余各基因转录剪接体在痛风与健康对照组均存在,且NAGA组患者NLRP3 mRNA表达显著低于HC组与AGA组,而AGA组、NAGA组患者NLRP3-2、NLRP3-3、NLRP3-4及PYCARD、PYCARD-1、PYCARD-2组mRNA表达显著高于HC组,提示在GA患者的炎症反应中,NLRP3可能发挥负向调控作用,而NLRP3-2、NLRP3-3、NLRP3-4及PYCARD、PYCARD-1、PYCARD-2可能发挥协同作用。我们还发现AGA组CASP1和CASP1-gamma mRNA表达均显著高于HC组、NAGA组,而AGA组CASP1-6 mRNA表达显著低于HC组,NAGA组CASP1-7 mRNA表达显著低于HC组,提示CASP1-6、CASP1-7 mRNA表达在GA患者的炎症过程中可能发挥负性调控作用,而CASP1和CASP1-gamma mRNA表达在GA患者炎症反应中可能发挥协同作用。值得注意的是我们的试验中用NLRP3-2剪接体引物进行PCR扩增时还可扩出x与y两条未知条带,用PYCARD-2剪接体引物进行PCR扩增时还可扩出x与y两条未知条带,且统计发现AGA组、NAGA组NLRP3-2(x) mRNA表达量均显著低于HC组,NAGA组NLRP3-2(x) mRNA表达量显著高于AGA组,NAGA组NLRP3-2(y) mRNA表达量显著高于HC组,其在GA患者发病过程中的作用有待进一步进行深入

研究。

我们研究发现 AGA 组血常规(WBC、GR、LY、MO)、肝、肾功能(ALT、AST、ALB、GLOB、UA、Cr、Ur)、血脂(TG、HDL-c、VLDL-c、apoA、apoB100)检测指标均显著高于 HC 组,且在 NAGA 组 WBC、肝、肾功能(ALT、AST、GLOB、UA、Cr、Ur)、血脂(TG、VLDL-c)检测指标也显著高于 HC 组,提示在 GA 患者的发病过程中炎症、免疫与代谢协同发挥作用。我们进一步将 AGA 组与 NAGA 组临床实验指标与 NLRP3 炎性体基因及其转录剪接体 mRNA 表达进行相关性分析后发现,AGA 组 WBC、GR 与 NLRP3、NLRP3-2、NLRP3-5、PYCARD-1、PYCARD-2、CASP1-6、CASP1-7、CASP1-beta、CASP1-alpha、CASP1-gamma mRNA 表达均呈正相关,GLOB 与 NLRP3、NLRP3-3、NLRP3-1 + 6、PYCARD-2、CASP1-6、CASP1-7 mRNA 表达均呈正相关,而 AST 与 CASP1-alpha、ALB 与 NLRP3-1 +6、apoA 与 NLRP3-1 + 6 mRNA 表达均呈负相关,apoA 与 NLRP3-5 mRNA 表达呈正相关,提示在 GA 患者的发病过程中,NLRP3 炎性体基因转录剪接体的特征性改变与痛风患者 WBC、GR、AST、ALB、apoA 指标密切相关,NLRP3 炎性体基因转录剪接体的特征性改变可能为 WBC、GR、AST、ALB、apoA 等指标改变的间接因素。NAGA 组 WBC、GR、MO、与 NLRP3 炎性体的部分基因转录剪接体 mRNA 表达均呈正相关,而 AST 与 CASP1-beta、TC 与 PYCARD、TC 与 CASP1、apoA 与 NLRP3-1 +6 mRNA 表达均呈负相关,进一步提示NLRP3炎性体基因转录剪接体在 GA 患者的炎症与免疫反应中发挥重要的调控作用,且提示 NLRP3 炎性体的部分基因转录剪接 mRNA 表达可能对痛风患者脂代谢发挥负性调控作用。从相关性方面还提示炎症与免疫反应在 GA 患者的急性期表现较为强烈。值得注意的是脂代谢在 GA 患者的发病过程中表现异常,且与 NLRP3 炎性体的部分基因转录剪接体 mRNA 相关,提示脂代谢异常可能为 GA 患者发病的协同因素[16-18]。

总之,寻找痛风发病的早期基因改变对痛风的早期诊断与治疗至关重要[19],研究 NLRP3 炎性体基因转录剪接体在 GA 患者 PBMCs 中表达的特征性改变,分析 GA 患者 NLRP3 炎性体基因转录剪接体的特征性改变与其临床实验指标的相关性分析,对痛风的诊断、预测病情的发展、治疗及预后的评估都具有重要的作用。然而,我们目前对 NLRP3 炎性体基因转录剪接体的研究尚处在初步阶段,由于 NLRP3 炎性体的部分基因转录剪接体 mRNA 编码序列完全相同或呈互相包含关系,我们目前尚不能对 NLRP3 炎性体的每一个基因转录剪接体设计独特的引物进行实时荧光定量检测,因此,对 NLRP3 炎性体基因转录剪接体的研究有待进一步通过不同的方法进行深入研究。

**参考文献:**

[1] Richette P, Bardin T. Gout[J]. Lancet, 2010, 375(9711): 318-328.
[2] Akahoshi T. Pathological mechanisms of gouty arthritis[J]. Nihon Rinsho, 2008, 66(4): 705-710.
[3] DANG Wan-Tai, ZHOU Jing-Guo, XIE Wen-Guang, *et al*. Mechanism of NLRP3 inflammasome in inflammatory response with gouty arthritis [J]. Chinese Journal of Immunology, 2014, 30(3): 373-377.
[4] Modrek B, Resch A, Grasso C, *et al*. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(13): 2850-2859.
[5] Wallace S L, Robinson H, Masi A T, *et al*. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout [J]. Arthritis Rheum, 1977, 20(3): 895-900.
[6] Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing[J]. Nat Genet, 2002, 30(1): 13-19.
[7] Johnson J M, Castle J, Garrett-Engele P, *et al*. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays [J]. Science, 2003, 302(5653): 2141-2144.
[8] Wang E T, Sandberg R, Luo S, *et al*. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes[J]. Nature, 2008, 456(7221): 470-476.
[9] Moore M J, Wang Q, Kennedy C J, *et al*. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis[J]. Cell, 2010, 142(4): 625-636.
[10] Barash Y, Calarco J A, Gao W, *et al*. Deciphering the splicing code [J]. Nature, 2010, 465(7294): 53-59.
[11] Akahoshi T. Pathological mechanisms of gouty arthritis[J]. Nihon Rinsho, 2008, 66(4): 705-710.
[12] Kingsbury S R, Conaghan P G, McDermott M F. The role of the NLRP3 inflammasome in gout[J]. J Inflamm Res, 2011, 4: 39-49.
[13] Fukata M, Vamadevan A S, Abreu M T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders[J]. Semin Immunol, 2009, 21(4): 242-253.
[14] Mayor A, Martinon F, De-Smedt T, *et al*. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses[J]. Nat Immunol, 2007, 8(5): 497-503.
[15] Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 10-22.
[16] Tsai H T, Wang P H, Tee Y T, *et al*. Imbalanced serum concentration between cathepsin B and cystatin C in patients with pelvic inflammatory disease[J]. Fertil Steril, 2009, 91(2): 549-555.
[17] Krishnan E. Inflammation, oxidative stress and lipids: the risk triad for atherosclerosis in gout[J]. Rheumatology (Oxford), 2010, 49(7): 1229-1238.
[18] Hyka N, Dayer J M, Modoux C, *et al*. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes [J]. Blood, 2001, 97(8): 2381-2389.
[19] Pan Q, Shai O, Lee L J, *et al*. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. Nat Genet, 2008, 40(12): 1413-1415.

(**收稿**:2014-01-25;**修回**:2014-03-16)
(编辑 吴培红)