

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.015.html>

◇临床医学研究◇

溃疡性结肠炎血小板中钾通道和 NLRP3 表达的临床意义

叶盛林, 梅咏玉, 韩 珝, 杨 青, 胡 翠, 刘晓昌, 梅 俏, 许建明

摘要 目的 探讨溃疡性结肠炎(UC)血小板中钾通道和 NLRP3 的表达, 以及与 UC 临床特征的关联分析。方法 收集 11 例正常对照组和 17 例 UC 患者临床资料。提取血小板, 采用 RT-PCR、Western blot 法检测 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 的表达水平。结果 与正常对照组相比, UC 患者血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 mRNA 表达量均明显增加($t = -6.067, -4.991, -18.981, P < 0.05$), 与 UC 严重程度无明显相关。UC 患者血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达量均明显高于对照组, 差异有统计学意义($t = -9.627, -7.39, -7.821, P < 0.05$), 与 UC 严重程度无明显相关。UC 患者血小板中 Kca3.1 与 NLRP3 蛋白表达水平明显相关($r = 0.877, P < 0.05$), Kv1.3 与 NLRP3 蛋白表达水平有一定的相关性, 但差异无统计学意义。UC 患者血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达与患者临床指标红细胞沉降率、C 反应蛋白及 Mayo 评分均不相关。结论 UC 患者血小板中 NLRP3 与钾通道表达增高, 两者具有一定相关。

关键词 溃疡性结肠炎; Kca3.1; Kv1.3; 钾通道; NLRP3

中图分类号 R 574.621

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)03-0401-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.015

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD) 中肠道炎症与止血机制密切相关^[1], 可能与血小板的功能改变有关, 血小板不仅参与止血过程, 还可分泌炎症因子(如 IL-1 β), 参与炎症过程^[2]。IBD 患者的显著特征包括血小板功能活化, 如 GPIIb/IIIa、P-选择蛋白和 CD40L 表达增加, 其中溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 患者血小板作为重要的炎症细胞也有明显的功能活化^[3]。研究^[2]显示血小板参与炎症反应需要 IL-1 β 信号和 NLRP3 炎症小体活化, 静息状态血小板可表达 NLRP3、接头分子, 在

2017-11-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81470809)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 安徽省消化病重点实验室, 合肥 230022

作者简介: 叶盛林, 男, 硕士研究生;

梅 俏, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: meiqiao@hotmail.com

活化状态血小板中两者共定位组装成功能性 NLRP3 炎症小体, 激活 procaspase-1 形成 caspase-1, 产生 IL-1 β 等炎症因子, 促进炎症过程。

NLRP3 是核苷酸结合寡聚域样受体家族分子中的一种胞内型受体, 与接头分子及效应分子(caspase-1) 组装成 NLRP3 炎症小体。NLRP3 炎症小体的激活需要 NF- κ B 介导炎症小体前体表达上调, 招募接头分子组装成特定结构, 活化 procaspase-1, 产生炎症因子 IL-1 β 和 IL-18。在炎症性疾病(如自身免疫性疾病、感染、败血症)中均有 NLRP3 炎症小体的参与^[4]。钾和钙是激活 NLRP3 炎症小体的关键介质^[5]。Kv1.3 通道是血小板的主要电压门控钾通道, Kv1.3 通道促进活化血小板的早期钙离子内流, 胞浆内钙离子浓度明显增加, Kv1.3 通道可能通过增加激动剂诱发的 Ca^{2+} 流入影响血小板活化^[6]。血小板中存在中电导的钙激活的钾通道(Kca3.1), 可能与 Kv1.3 一起协同调节血小板内外钾和钙浓度, 影响 NLRP3 炎症小体和血小板的活化过程^[6-7]。因此, 该研究通过检测活动期 UC 血小板 Kca3.1、Kv1.3 和 NLRP3 的表达情况, 探讨溃疡性结肠炎血小板中 NLRP3 表达与钾通道的关系及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院明确诊断的 UC 患者 17 例, 年龄 19~64(38.71 ± 14.12)岁, 采用改良 Mayo 评分标准进行疾病活动性评分, 17 例 UC 均为活动期, 其中轻度 3 例, 中度 9 例, 重度 5 例。按 2012 年我国炎症性肠病诊断共识意见(广州)作为 UC 诊断标准^[8]。正常对照组为经体检均合格及近 3 个月无胃肠道症状的 11 例健康志愿者, 年龄 24~55(35.00 ± 9.86)岁, 两组年龄差异无统计学意义。

1.2 标本采集 收集患者入院后(24 h 内)次日晨的 5 ml 全血, 立即低速离心(1 300 r/min, 15 min)获取富血小板血浆(PRP), 取出 PRP 再次离心(3 000 r/min, 20 min)去除血浆后, 获取血小板于

-80 °C 保存。

1.3 RT-PCR 方法检测血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 的 mRNA 表达 将血小板解冻, 加入 TRIzol(美国 Invitrogen 公司) 匀浆裂解, 再依次以氯仿、异丙醇、75 % 乙醇(DEPC 水配制) 抽提, 获取干燥 RNA 沉淀后, 加入 DEPC 水溶解得总 RNA。按逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司) , 总 RNA 被逆转录为 cDNA 。 GAPDH 作为内参, 按试剂盒说明书(德国 Qiagen 公司) 的步骤进行加样扩增获取 RT-PCR 产物, 引物序列和产物长度, 反应条件均为 97 °C 、5 min, 93 °C 、30 s, 52 °C 、30 s, 70 °C 、40 s, 36 个循环; 70 °C 、10 min, 4 °C 、10 min。紫外凝胶成像系统分析各样本中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 的表达情况。见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列和产物长度

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度
GAPDH	F: CAAGGTCTCCATGACAACCTTG R: GTCCACCACCCCTGTTGCTGTAG	496
Kv1.3	F: CAAACGCTGAAGCGTCCAT R: GGCAGTGGAAATTGCCCGTT	498
Kca3.1	F: CAGCATCGCGCTCTCAATC R: GGCAGCGGACTCCTTCATCT	409
NLRP3	F: CACCAGCCATTCCCTGACCA R: AGGTCAATTGTTGCCAGGCT	387

1.4 Western blot 方法检测血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 的蛋白表达 取血小板解冻, 裂解(RIPA 细胞裂解液) 后, 离心取上清液, 按照 1 : 4 加入的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。沸水浴加热 10 min 后上样(每孔 15 μl) , 电泳, 300 mA 恒流转膜, 完成后洗去转膜液加 Western 封闭液(5% 脱脂奶粉) 封闭 2 h。参考一抗及二抗说明书, 按照合适的比例滴加一抗稀释液(Kca3.1 抗体属性为兔抗 1 : 200 稀释; Kv1.3 抗体属性为鼠抗 1 : 500 稀释; NLRP3 抗体属性为兔抗 1 : 200 稀释) , 4 °C 缓慢摇动孵育过夜。加入洗涤液(PBST) 洗涤 3 次, 每次洗涤 10 min, 按照相应比例加辣根过氧化物酶(HRP) 标记的二抗稀释液。室温孵育 2 h。加入洗涤液(PBST) 洗涤 8 h, 洗涤 3 次。最后用 ECL 发光试剂盒(美国 Thermo 公司) 进行蛋白检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 服从正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本均数的 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 定量资料采用 Pearson 相关分析。 *P*

< 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC 血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 mRNA 表达水平的改变 与正常对照组相比, UC 血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 mRNA 表达明显升高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05) 。见图 1。

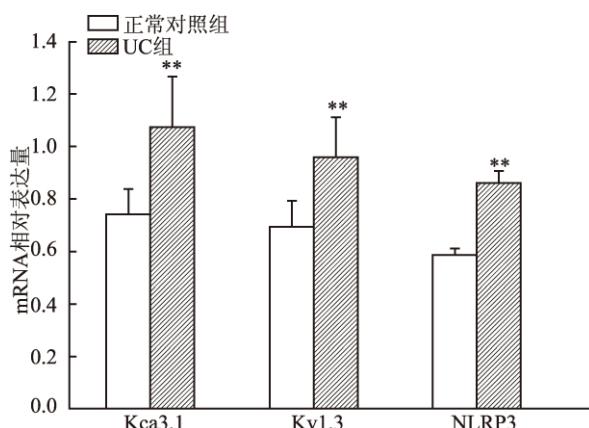


图 1 RT-PCR 法检测 Kca3.1、Kv1.3 和 NLRP3 在正常和 UC 血小板中的表达
与正常对照组比较: *** *P* < 0.01

2.2 UC 患者血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 mRNA 表达与疾病严重程度的关联分析 轻、中、重度三组 UC 患者, Kca3.1、Kv1.3、NLRP3 mRNA 表达均高于正常对照组, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。组间比较差异均无统计学意义。见表 2。

表 2 不同严重程度 UC 血小板中 Kca3.1、Kv1.3 和 NLRP3 mRNA 的相对表达

严重程度	Kca3.1	Kv1.3	NLRP3
轻度	1.04 ± 0.24	0.96 ± 0.23	0.84 ± 0.06
中度	1.08 ± 0.21	0.97 ± 0.16	0.87 ± 0.05
重度	1.09 ± 0.18	0.93 ± 0.13	0.85 ± 0.05
<i>F</i> 值	0.06	0.10	0.73
<i>P</i> 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05

2.3 UC 血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达水平的改变 与正常对照组比较, UC 血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达明显升高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 2。

2.4 UC 患者血小板中 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达与疾病严重程度的关联分析 轻、中、重度三组 UC 患者中血小板 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达进行比较, 差异无统计学意义; 提示血小板 Kca3.1、Kv1.3 及 NLRP3 蛋白表达水平与疾病的严

重程度无明显相关性。

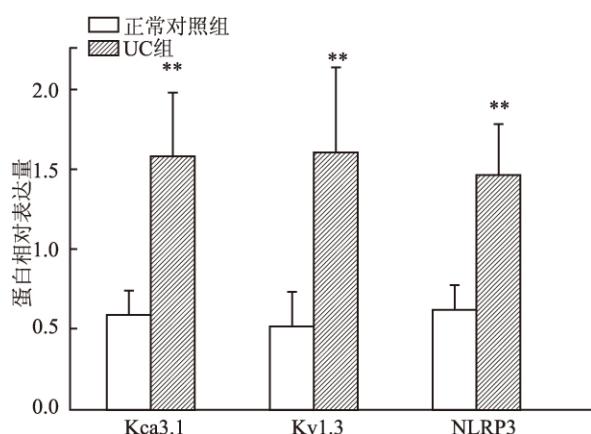


图2 Western blot法检测Kca3.1、Kv1.3和

NLRP3在正常和UC血小板中的表达

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 UC患者血小板中NLRP3蛋白与Kca3.1、Kv1.3蛋白表达水平的相关分析 相关分析显示, Kca3.1与NLRP3的蛋白表达水平明显相关, 差异有统计学意义($r=0.877, P<0.01$) (图3); Kv1.3与NLRP3的蛋白表达水平有一定的相关趋势, 差异无统计学意义。UC患者血小板Kca3.1、Kv1.3与NLRP3蛋白表达水平分别与红细胞沉降率(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、Mayo评分进行相关性分析, 均无明显相关性, 差异无统计学意义(表3)。

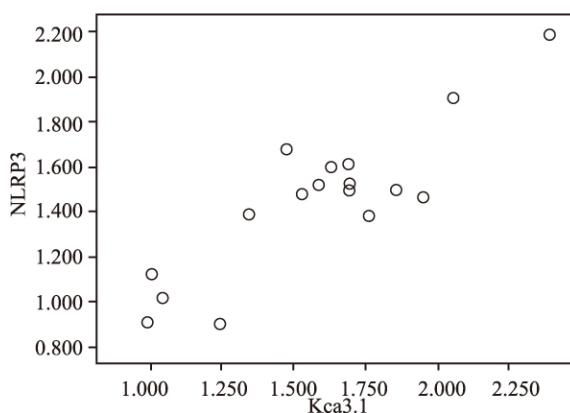


图3 NLRP3和Kca3.1在蛋白质水平的相关性分析

3 讨论

UC以反复发作的慢性非特异性肠道炎症为特征,发病机制尚不十分清楚。研究^[3-4]显示,血小板

表3 UC患者血小板蛋白质表达水平与
ESR、CRP和Mayo评分的相关性分析

项目	Kca3.1		Kv1.3		NLRP3	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值
ESR	0.272	0.290	-0.220	0.397	0.272	0.292
CRP	-0.185	0.495	-0.406	0.119	-0.238	0.375
Mayo	-0.131	0.616	-0.033	0.900	-0.033	0.900

炎症反应参与了UC的病理生理过程,在小鼠DSS结肠炎模型中发现活化血小板数量明显增加^[9]。血小板作为重要的炎症细胞在适应性免疫应答中具有关键作用,活化的血小板可以通过多种机制介导炎症和免疫应答,包括释放促炎、抗炎及血管生成因子,募集炎细胞到血管损伤和炎症部位^[10]。研究^[2]显示受登革热病毒感染患者体内血小板被激活及NLRP3-caspase-1炎症小体组装并介导血小板微粒中的IL-1 β 分泌,刺激血管内皮,导致通透性增加,加重渗出及炎症反应,IL-1 β 信号传导及NLRP3炎性小体活化参与血小板炎症过程。NLRP3基因与UC的易感性相关,可能在UC发病过程中起重要作用。研究^[11]显示NLRP3炎症小体在DSS结肠炎模型结肠组织中高表达,槐耳提取液通过降低结NLRP3及IL-1 β 表达,改善结肠炎症。NLRP3是NLRP3炎症小体的关键组成部分,是NLRP3炎性小体激活的限速步骤^[12]。因此,根据研究结果推测血小板中NLRP3的表达改变所致的炎症损伤可能与UC的发生过程有关。

血小板中主要存在Kv和Kca两种类型钾通道,分别以Kv1.3和Kca3.1为主^[6-7,13]。Mahaut-Smith^[7]研究发现血小板存在Ca²⁺依赖性K⁺通道(Kca通道)。使用膜片钳技术证实血小板中存在高密度电压门控K⁺通道(Kv通道)和Kca通道^[6-7]。研究^[6,14]显示血小板Kv1.3通道与血小板活化有关,Kca3.1可能参与此过程,钾离子通过钾通道外流所致的细胞内低钾是导致NLRP3炎症小体活化重要条件,抑制钾离子外流可抑制NLRP3炎症小体的活化。相关研究^[15]显示K⁺外排可能是所有NLRP3刺激致NLRP3激活所必需的共同特征。因此,UC中血小板Kv1.3、Kca3.1钾通道与NLRP3炎症小体的表达是否改变目前尚不清楚。

本研究显示,UC血小板中Kca3.1、Kv1.3及NLRP3的mRNA和蛋白表达明显增高,提示血小板中Kca3.1、Kv1.3及NLRP3的过表达可能参与UC的病理生理过程;而Kca3.1、Kv1.3及NLRP3的表达水平与UC的严重程度以及CRP、ESR及Mayo评

分等均无明显相关性,进一步提示以上三种物质的表达可能与病情严重程度及活动性无关。研究^[3,6,14]显示,UC中血小板明显活化,血小板活化与钾通道和NLRP3炎症小体活化有关,推测UC血小板中Kca3.1、Kv1.3可能引起胞液内钾和钙离子浓度改变,进一步改变NLRP3活化过程,促进血小板活化,参与UC的炎症过程。另一方面,NLRP3与Kca3.1、Kv1.3蛋白表达水平有一定相关,提示UC血小板中NLRP3过表达与血小板中的钾通道增多可能有关。因此,推测由于感染等诱因,引起UC血小板中Kca3.1和Kv1.3钾通道明显增多及血小板内外钾钙离子浓度改变,促进NLRP3表达及NLRP3炎症小体活化,促进血小板活化,释放炎症因子,促进UC肠道炎症的发生,但UC血小板活化的具体机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Danese S, Papa A, Saibeni S, et al. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: the clot thickens [J]. American J Gastroentero, 2007, 102(1): 174-86.
- [2] Hottz E D, Lopes J F, Freitas C, et al. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation [J]. Blood, 2013, 122(20): 3405-14.
- [3] Collins C E, Cahill M R, Newland A C, et al. Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology, 1994, 106 (4): 840-5.
- [4] Wirnsberger G, Zwolanek F, Asaoka T, et al. Inhibition of CBLB protects from lethal candida albicans sepsis [J]. Nat Med, 2016, 22(8): 915-23.
- [5] Man S M, Kanneganti T D. Regulation of inflammasome activation [J]. Im munol Rev, 2015, 265(1): 6-21.
- [6] McCloskey C, Jones S, Amisten S, et al. Kv1.3 is the exclusive voltage-gated K⁺ channel of platelets and megakaryocytes: roles in membrane potential, Ca²⁺ signalling and platelet count [J]. J Physiol, 2010, 588(9): 1399-406.
- [7] Mahaut-Smith M P. Calcium-activated potassium channels in human platelets [J]. J Physiol, 1995, 484(1): 15-24.
- [8] 胡品津. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年·广州)解读[J]. 胃肠病学, 2012, 17(12): 709-11.
- [9] Yan S L, Russell J, Harris N R, et al. Platelet abnormalities during colonic inflammation [J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 19 (6): 1245-53.
- [10] Vieira-de-Abreu A, Campbell R A, Weyrich A S, et al. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum [C]. Semin Immunopathol, 2012, 34(1): 5-30.
- [11] Wang L, Yu Z, Wei C, et al. Huaier aqueous extract protects against dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 32937-45.
- [12] Latz E, Xiao T S, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6): 397-411.
- [13] Mahaut-Smith M P, Rink T J, Collins S C, et al. Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets [J]. J Physiol, 1990, 428: 723-35.
- [14] Pétrilli V, Papin S, Dostert C, et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(9): 1583-9.
- [15] Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, et al. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter [J]. Immunity, 2013, 38(6): 1142-53.

Clinical significance of potassium channel and NLRP3 expression in platelets of ulcerative colitis

Ye Shenglin, Mei Yongyu, Han Wei, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,
The Key Laboratory of Gastroenterology Anhui Province, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the expression of potassium channels and NLRP3 in platelets of ulcerative colitis (UC), and to analyze the correlation with UC. **Methods** Clinical data were collected from 11 normal controls and 17 patients with UC. The levels of platelet Kca3.1, Kv1.3 and NLRP3 were detected by RT-PCR and Western blot after platelet extraction. **Results** Compared with control group, the expression of Kca3.1, Kv1.3 and NLRP3 in platelets from the UC patients were increased significantly at the mRNA level ($t = -6.067, 4.991, -18.981, P < 0.05$), which were not related to the severity of UC. The expression of Kca3.1, Kv1.3 and NLRP3 protein in platelets of UC patients was significantly higher than those of the control group ($t = -9.627, -7.39, -7.821, P < 0.05$), and there was no significant correlation between their expression and the severity of UC. Correlation

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.016.html>

种植前遗传学诊断/筛查周期的临床资料分析

向卉芬^{1,2,3}, 徐祖灌^{1,2,3}, 张影^{1,2,3}, 郝燕^{1,2,3}, 陈大蔚^{1,2,3}, 章志国^{1,2,3}, 周平^{1,2,3}, 曹云霞^{1,2,3}

摘要 目的 通过回顾性分析种植前遗传学诊断/筛查(PGD/PGS)治疗周期的资料,旨在总结PGD/PGS治疗过程中的特点及规律,为临床提供参考。**方法** 收集行PGD/PGS助孕的283对夫妇的309个治疗周期信息,分析病因构成、治疗过程、妊娠结局及新生儿情况。**结果** 283对夫妇中,因染色体异常行PGD治疗的比例最高,共223例,占78.8%;比较应用荧光原位杂交(FISH)、微阵列比较基因组杂交技术(array-CGH)和二代测序技术(NGS)这3种方法的临床资料,结果显示array-CGH组的胚胎活检成功率高于另外两组,差异有统计学意义($P < 0.05$);FISH组的正常胚胎率高于array-CGH和NGS组,但胚胎种植率低于这两组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);FISH组临床妊娠率低于NGS组,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同病因行PGD/PGS临床妊娠率比较,差异均无统计学意义;通过PGD/PGS技术出生子代无出生缺陷,且FISH与array-CGH诊断方法比较,新生儿情况均差异无统计学意义。**结论** PGD/PGS技术是治疗遗传病高危患者生育问题的有效措施;FISH、array-CGH和NGS这3种诊断法均是有效的胚胎诊断方法,但array-CGH法和NGS法的诊断效率较FISH高。

2017-11-29 接收

基金项目: 人类辅助生殖技术质量控制体系建立的相关研究(编号: 201402004); 国家自然科学基金青年基金(编号: 81501232)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖医学中心, 合肥 230022

²安徽医学生殖健康与遗传重点实验室, 合肥 230022

³安徽省生命资源保存与人工器官工程技术研究中心, 合肥 230022

作者简介: 向卉芬,女,博士,主治医师;
曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com

关键词 种植前遗传学诊断; 种植前遗传学筛查; FISH; array-CGH; NGS; 回顾性分析

中图分类号 R 714.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0405-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.016

遗传性疾病已经成为威胁人类健康的主要疾病之一。1990年世界首例种植前遗传学诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)技术婴儿的诞生,开辟了人类干预遗传性疾病的新纪元^[1]。PGD是指在移植之前对胚胎进行遗传学检测,确定胚胎的遗传组成,选择正常或没有发病风险的胚胎移植,避免有遗传病发病风险的婴儿出生。种植前遗传学筛查(preimplantation genetic screening, PGS)技术是指在移植前对早期胚胎进行非整倍体筛查,挑选正常的胚胎移植,以期提高种植率,降低流产率。诊断技术包括PCR技术、荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术、微阵列比较基因组杂交技术(array comparative genomic hybridization, array-CGH)、二代测序技术(next generation sequencing, NGS)等。该文回顾性分析了实施PGD/PGS技术的共309个治疗周期的资料,包括对病因构成、治疗过程及临床结局的分析和总结,旨在为临幊上PGD/PGS的具体实施提供参考。

1 材料与方法

1.1 资料来源

1.1.1 病例资料 2009年1月~2016年12月在安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心行PGD/PGS助孕的283对夫妇的309个治疗周期的资料。

analysis showed that the expression of Kca3.1 and NLRP3 protein in platelets of UC was significantly correlated ($r = 0.877$, $P < 0.05$) . There was a general correlation between Kv3.1 and NLRP3 expression at protein level, but the difference was not statistically significant. The expression of Kca3.1, Kv1.3 and NLRP3 proteins in platelets of UC were not correlated with erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein and Mayo scores. **Conclusion** The expression of NLRP3 and potassium channels in platelets of UC patients is increased, and there is a certain correlation between these two index.

Key words ulcerative colitis; Kca3.1; Kv1.3; potassium channel; NLRP3