

NLRP3 在鼻咽癌中的表达及其临床意义

汤俊照¹ 汪亦品²

(1.宣城市中心医院 五官科,安徽 宣城 242000; 2.南京医科大学 病理学与病理生理学系,江苏 南京 210029)

【摘要】目的: 探讨炎症小体 NLRP3 在鼻咽癌组织和正常鼻咽黏膜组织中的表达水平变化及其与患者临床预后的关系。方法: 采用实时定量 PCR 和免疫组化检测 40 例鼻咽癌组织和 12 例正常鼻咽黏膜组织中 NLRP3 的表达水平。结果: ①NLRP3 在鼻咽癌组织中表达显著高于正常鼻咽黏膜组织 ($P<0.05$); ②在鼻咽癌患者中,NLRP3 的表达水平与肿瘤的淋巴结转移以及患者的临床预后有关 ($P<0.05$) ,NLRP3 高表达患者较低表达患者具有更好的局部无复发生存率和无瘤生存率,但与年龄和组织病理类型无明显相关关系($P>0.05$) 。结论: NLRP3 具有提示鼻咽癌肿瘤转移及判断患者预后的价值。

【关键词】NLRP3; 肿瘤转移; 鼻咽癌; LRSF/DSF

【中图分类号】R 739.63 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.04.021

NLRP3 expression and its clinical significance in nasopharyngeal carcinoma

TANG Junzhao ,WANG Yipin

Department of ENT ,Xuancheng Central Hospital ,Xuancheng 242000 ,China

【Abstract】Objective: To determine the expression level change of inflammasome NLRP3 in tissues of nasopharyngeal carcinoma(NPC) and normal nasopharyngeal mucosa and investigate the level change with clinical prognosis.**Methods:** Real-time quantitative PCR and immunohistochemistry technique were used to detect NLRP3 expression level in 40 patients with NPC and in 12 subjects with normal nasopharyngeal mucosa.**Results:** ①The NLRP3 expression was significantly higher in NPC tissue than that in normal nasopharyngeal mucosa($P<0.05$); ②Expression level of NLRP3 was correlated with lymph node metastasis of the tumor and clinical prognosis in patients with nasopharyngeal cancer($P<0.05$) .Although patients with higher NLRP3 expression level had better local recurrence-free survival (LRF5) and disease-free survival (DFS) ,yet NLRP3 level had no obvious correlation with patients' age and histopathologic types of tumor ($P<0.05$) .**Conclusion:** Inflammasome NLRP3 is better indicative of tumor metastasis and prognosis for patients of NPC ,and higher NLRP3 level may lead to better prognosis.

【Key words】 NLRP3; neoplasm metastasis; nasopharyngeal carcinoma; LRSF/DSF

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma ,NPC) 是一种侵袭性强的恶性肿瘤,恶性程度高,早期易发生淋巴结和全身远处转移,具有相当高的病死率,但其发生发展的机制目前尚不是很清楚^[1]。

近年来,炎症-肿瘤的相关研究已成为肿瘤学研究重点,流行病学已证实至少 25% 的人类恶性肿瘤与炎症和慢性感染有关^[2]。研究发现,致炎因子水平升高与卵巢癌、头面部鳞状细胞癌、乳腺癌等各种肿瘤密切相关^[3-6]。鉴于此,本研究采用实时定量 PCR 和免疫组化技术检测 40 例鼻咽癌组织和 12 例

正常鼻咽黏膜组织中 NLRP3 的表达水平,旨在探讨 NLRP3 的表达水平与鼻咽癌之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集宣城市中心医院病理科 2000 年 10 月~2010 年 7 月外科手术切除和存档的鼻咽癌组织 40 例,所有标本均常规经 10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋。40 例患者中,男 28 例,女 10 例;年龄 23~62 岁,中位年龄 43 岁。按福州会议^[7]进行临床分期: I 期 5 例、II 期 13 例、III 期 16 例、IV

收稿日期: 2015-11-22

作者简介: 汤俊照(1981-) ,男,住院医师, (电话) 18956308352 (电子信箱) 285127072@ qq.com;

汪亦品,女,实验师, (电子信箱) yipin698@ 163.com,通信作者。

期 6 例; 复发 22 例, 无复发 18 例; 中位随访时间 60.5 月, 随访期间死亡 6 例。所有病例病理活检前均未行任何治疗。对照组 12 例正常鼻咽黏膜组织来自我院同期体检病例。52 例中 7 例组织进行实时定量 PCR 检测。

1.2 免疫组织化学染色 采用免疫组化染色 SP 法 按试剂盒操作步骤进行染色。NLRP3 兔抗人多克隆抗体购自北京博赛森生物技术公司, 稀释度 1:50; SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自杭州碧云天生物技术公司。光镜下肿瘤细胞出现棕黄色着色者判定为阳性, 并用 0、1、2 和 3 分别代表阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性。蛋白表达量由阳性信号着色强度的量化得分进行判定, 其中弱阳性代表低表达, 中等阳性、强阳性代表高表达。

1.3 实时定量 PCR 采用 Primer 3.0 在线设计来设计实时定量 PCR 引物, 遵循跨内含子的原则, 以避免非特异性及引物二聚体产生, 委托上海 Invitrogen 公司合成(见表 1)。

表 1 PCR 引物序列

名称	引物序列
GAPDH	F: 5'-GTCTTCACTACCATGGAGAAGG -3'
	R: 5'-TCATGGATGACCTTGCCAG -3
NLRP3	F: 5'-GTGGTGACCCTCTGTGAGGT -3'
	R: 5'-TCTTCCTGGAGCGCTTCTAA -3'

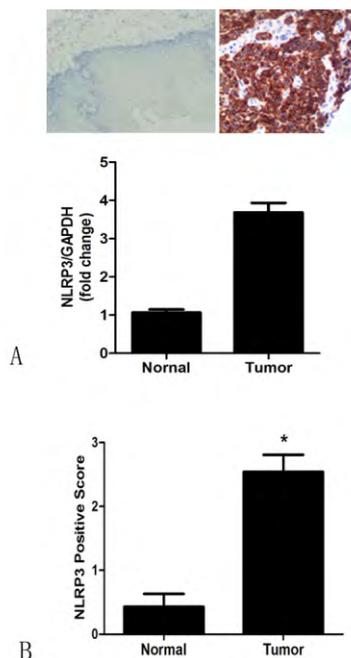
采用 TRIZOL 一步法抽提细胞及组织的总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 进行逆转录反应, 采用 SYBR green 实时定量 PCR 方法, 反应体系为 25 μL, 置于 ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增, 反应条件为 95 °C, 10 min; 随后以 95 °C, 15 s 和 60 °C, 1 min 循环 40 次。采用参照基因的 Ct 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量, 采用相对定量法计算各基因 mRNA 表达水平。

1.4 统计学方法 使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。临床病理类型采用 Fisher 精确概率法检验, 生存曲线使用 Kaplan-Meier 法进行绘制, 两组间比较用 t 检验; Cox 危险因素模型用多因素方差分析法。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 炎症小体 NLRP3 在鼻咽癌组织中表达升高 免疫组化显示 NLRP3 主要表达于细胞质内, 偶见于细胞核(图 1A、B)。NLRP3 在鼻咽癌组织中阳性表达明显高于正常鼻咽黏膜组织(升高近 6 倍), 差异有统计学意义(P<0.01)。同样, 实时定量 PCR 显

示鼻咽癌组织中 NLRP3 表达量较正常组织升高近 4 倍, 差异具有统计学意义(P<0.01)。



A: NLRP3 在 NPC 和正常组织中的表达; 上图为代表性免疫组化图片, 下图为免疫组化阳性评分。B: 实时定量 PCR 法检测鼻咽癌和正常鼻咽黏膜组织中 NLRP3 的表达 (* P<0.05 n=7)。

图 1 NLRP3 在鼻咽癌组织中的表达

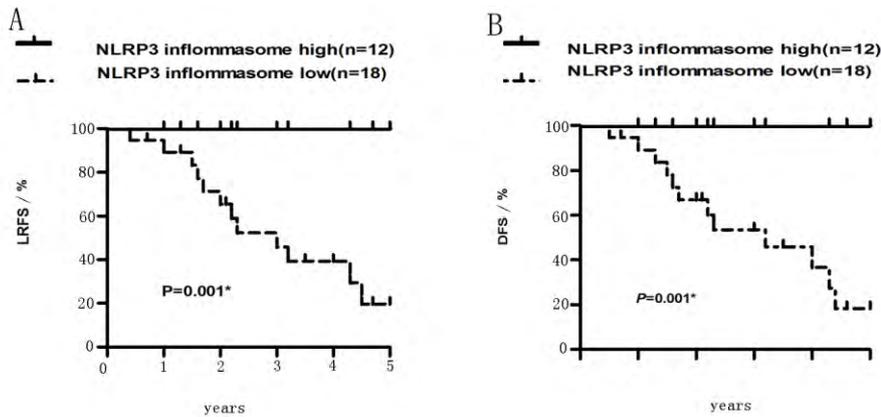
2.2 鼻咽癌组织中 NLRP3 的表达与预后的关系

Kaplan-Meier 生存曲线显示肿瘤组织中 NLRP3 高表达患者较低表达患者具有更好的局部无复发生存率(local recurrence-free survival, LRFS) 和无瘤生存率(disease-free survival, DFS), 差异具有统计学意义(P<0.05, 图 2A、B)。

2.3 鼻咽癌组织中 NLRP3 表达水平与各临床参数之间的关系 鼻咽癌组织中 NLRP3 的表达水平与肿瘤临床病理类型、患者年龄无明显相关性, 而和肿瘤的淋巴结转移有关(P<0.05, 表 2)。

表 2 鼻咽癌组织中 NLRP3 表达水平与各临床参数的关系

类别	例数	NLRP3 表达水平		P
		高	低	
年龄/岁				0.751
≤45	22	10	12	
>45	18	10	8	
组织类型				1.000
基底样细胞鳞癌	7	3	4	
未角化癌	33	17	16	
淋巴结转移				<0.001
有	16	14	2	
无	24	6	18	



A: Kaplan-Meier 生存曲线分析鼻咽癌患者肿瘤组织中炎症小体 NLRP3 的表达水平高低与患者 LRFS 之间的关系。B: Kaplan-Meier 生存曲线分析鼻咽癌患者肿瘤组织中炎症小体 NLRP3 的表达水平高低与患者 DFS 之间的关系。

图 2 鼻咽癌组织中 NLRP3 表达水平高低与 LRFS 和 DFS 的关系

3 讨论

炎症是机体受到多种体内外因素刺激后产生的局部或全身性应答反应,也是机体针对肿瘤免疫应答和损伤修复的重要机制。许多研究表明,炎症细胞及其因子在肿瘤的发生发展和免疫逃逸等方面的促进作用远大于其本身的抗肿瘤效应,对炎症-肿瘤相互关系的研究是人类恶性肿瘤研究中十分重要的环节^[8]。

炎症小体是一种细胞内大分子量的多蛋白复合体,由类型识别受体(如 NLRP3、NLRC4、AIM2 等)、接头蛋白 ASC 及 caspase-1 组成^[9],是天然免疫系统的重要组成部分。炎症小体能识别病原相关分子模式(PAMPs)^[10]或者宿主来源的危险信号分子(DAMPs)^[11]。炎症小体能够调节半胱天冬酶-1(caspase-1)的活化进而在天然免疫防御的过程中促进细胞因子前体 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 的切割成熟,发挥生物学效应^[12-13]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)是最具代表性的炎症小体。NLRP3 炎症小体在很多疾病中都发挥重要作用。Zhou 等发现高浓度的葡萄糖能刺激胰岛细胞激活 NLRP3 炎症小体,产生 IL-1 β ,引发炎症反应^[14]。在肿瘤研究中,人们发现,NLRP3 通过剪切糖皮质激素受体而诱导急性白血病(ALL)的糖皮质激素抵抗^[15]。而在结肠癌^[16]、胶质瘤^[17]中,NLRP3 炎症小体可抑制肿瘤的迁移及增值,表现出了组织差异性。

目前 NLRP3 在鼻咽癌中的角色尚不十分清楚。本研究通过对 40 例有临床随访资料的 NPC 患者进行分析,NLRP3 在肿瘤组织中的表达水平显著高于正常组织,表明 NLRP3 可能参与了 NPC 肿瘤的发

生。我们知道,NPC 治疗的最大障碍是肿瘤极易发生淋巴结转移,导致患者预后普遍较差。预防、预测并抑制 NPC 的转移对改善 NPC 患者的生存率无疑是非常关键的。而目前 NLRP3 与 NPC 淋巴结转移之间的关系却不清楚。本研究中,我们通过对 NLRP3 的表达与鼻咽癌患者临床各参数之间的统计学结果进行分析,发现淋巴结转移患者肿瘤组织中 NLRP3 的表达显著低于无转移的患者。同时我们也发现鼻咽癌组织中炎症小体蛋白 NLRP3 表达水平高低与患者的 LRFS 和 DFS 具有明显的相关性,NLRP3 越高,LRFS 和 DFS 越好,提示 NLRP3 参与了肿瘤的进展过程,在局部肿瘤组织中过表达炎症小体 NLRP3 可能起到控制肿瘤的作用。但 NLRP3 的水平高低却与患者年龄和肿瘤的病理类型无明显相关性。综上所述,本研究发现了 NLRP3 可能在 NPC 肿瘤的进展中发挥重要作用,可作为独立的良好预后分子标志物,为肿瘤提供有效的治疗靶点。

【参考文献】

[1] CHUA DT, SHAM JS, WEI WI *et al.* The predictive value of the 1997 American Joint Committee on Cancer stage classification in determining failure patterns in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer* 2001, 92(11) : 2845-2855.

[2] PARKIN DM. The global health burden of infection - associated cancers in the year 2002 [J]. *Int J Cancer* 2006, 118(12) : 3030-3044.

[3] CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I *et al.* A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Cell* 2011, 147(2) : 358-369.

[4] MARTONE T, BELLONE G, PAGANO M *et al.* Constitutive expression of interleukin-18 in head and neck squamous carcinoma cells [J]. *Head Neck* 2004, 26(6) : 494-503.

- [5] MERENDINO RA ,GANGEMI S ,RUELLO A *et al.* Serum level so finter leukin-18 and sICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations[J].*Int J BiolMarkers* 2001 ,16(2) : 126-129.
- [6] ORENGO AM ,FABBI M ,MIGLIETTA L *et al.* Interleukin (IL) -18 biomarker of human ovarian carcinoma ,is pre-dominantly released as biologically inactive precursor [J].*Int J Cancer* ,2011 , 129(5) : 1116-1125.
- [7] 苏胜发 ,卢泰祥 ,赵充 ,等.基于调强放疗远期结果的鼻咽癌⁹分期 2008 分期结果比较[J].*中华放射肿瘤学杂志* ,2010 ,19 (3) : 185-189.
- [8] STEIGMAN SA ,KUNISAKI SM ,WILKINS-HAUG L *et al.* Optical properties of human amniotic fluid: implications for video fetoscopic surgery [J].*Fetal Diagn Ther* 2010 27(2) : 87-90.
- [9] SCHRODER K ,TSCHOPP J. The inflammasomes [J]. *Cell* ,2010 , 140(6) : 821-832.
- [10] RATHINAM VA ,JIANG Z ,WAGGONER SN *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses [J].*Nat Immunol* 2010 ,11: 395-402.
- [11] MARIATHASAN S ,WEISS DS ,NEWTON K *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP [J].*Nature* , 2006 ,440: 228-232.
- [12] HUANG YT ,SHEEN TS ,CHEN CL *et al.* Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinomas: a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4PT cells [J].*Cancer Res* ,1999 ,59 (7) : 1599-1605.
- [13] ALLEN IC ,TEKIPPE EM ,WOODFORD RM *et al.* The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer [J].*The Journal of Experimental Medicine* 2010 207(5) : 1045-1056.
- [14] ZHOU R ,TARDIVEL A ,TH RENS B *et al.* Thioredoxin-interacting protein link soxidative stressto iflammasome activation [J].*Nat Immunol* 2010 ,11(5) : 136 -140.
- [15] PAUGH SW ,BONTEN EJ ,SAVIC D *et al.* NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor causeglucocorticoid resistance in leukemia cells [J].*Nat Genet* , 2015 47(6) : 607-614.
- [16] DUPAUL-CHICOINE J ,ARABZADEH A ,DAGENAIS M *et al.* The NLRP3 inflammasome suppresses colorectal cancer metastatic growth in the liver by promoting natural killer cell tumoricidal activity [J].*Immunity* 2015 43(4) : 751-763.
- [17] LI L ,LIU Y. Aging-related gene signature regulated by Nlrp3 predicts glioma progression [J].*Am J Cancer Res* ,2014 5(1) : 442-449.

(上接第 373 页)

我们通过 TCT、宫颈细胞 DNA 定量分析两种方法在宫颈癌筛查中的应用价值比较,结果显示:细胞 DNA 定量分析灵敏度高于 TCT,而将细胞 DNA 异倍体 ≥ 3 个定为活检标准则特异度也会明显升高,由此筛查出宫颈癌高危人群做进一步确诊,并提示该群体是重点随访对象,我们应该继续进行跟踪与诊治,预防宫颈癌的发生、发展。

综上所述,在宫颈细胞恶变过程中,DNA 含量的改变较形态学变化要早,故此,DNA 定量分析是早期筛查宫颈癌前病变及宫颈癌的有力手段,相对宫颈活检而言,具有取样简单、无损伤、操作简便^[10]等优点,同时采用该项技术进行宫颈癌筛查也有效解决了在基层开展大规模普查往往缺乏应有的技术和有经验的细胞学医生的问题,成本效益合理,可考虑作为适合基层大规模妇女普查宫颈癌一种筛查方法予以推广。

【参考文献】

- [1] 曹泽毅.中华妇产科学(临床版) [M].2 版.北京:人民卫生出版社 2010: 583-605.
- [2] 曹泽毅.中华妇产科学[M].2 版.北京:人民卫生出版社 2004: 1848-1852,2012-2028.
- [3] 梅天琼,郑丽波,郭玲,等.宫颈液基细胞筛查在宫颈癌筛查中的临床应用[J].*中国实验诊断学* 2011 ,15(7) : 1180-1181.
- [4] 周权,黄民主,黄霜,等.中国已婚妇女宫颈癌发病影响因素 Meta 分析[J].*中国癌症杂志* 2011 21(2) : 125-129.
- [5] 张桂贤,孙琳,刘松,等.DNA 定量分析可用于宫颈癌及癌前病变的早期筛查[J].*中国计划生育学杂志* ,2005 ,13(11) : 681-683.
- [6] 王随郎.郟县妇科疾病普查中宫颈癌筛查的研究[J].*中国当代医药* 2010 ,17(30) : 134-135.
- [7] 温寿青,邱立,钟美莲.TCT 制片质量控制和宫颈癌诊断[J].*现代肿瘤医学杂志* 2009 ,17(8) : 1430-1431.
- [8] GROTE H J ,FRIEDRICHS N ,POMJANSKI N *et al.* Prognostic significance of DNA cytometry in carcinoma of the uterine cervix FIGO Stage I B and II [J].*Anal cell Pathol* ,2001 ,23(1) : 97-105.
- [9] RENMERBACH TW ,WEIDENGBACH H ,POMJANSKI N *et al.* Cytologic and DNA Cytometric early diagnosis of oral cancer [J].*Anal Cell Pathol* 2001 23(4) : 211-221.
- [10] 方辉,戎寿德,乔友林,等.宫颈癌及其癌前病变筛查方法现状 [J].*中国医学科学院学报* 2001(6) : 638-641.