

# NLRP3 炎症小体基因在 HPV 感染子宫颈细胞中的表达差异研究

毛 焕<sup>1</sup>, 潘建立<sup>2</sup>, 王长友<sup>1</sup>

(天津市蓟州区人民医院病理科<sup>1</sup>, 普外科<sup>2</sup>, 天津 301900)

**摘要:**目的 探讨 NLRP3 炎症小体相关基因在 HPV 感染子宫颈细胞中的差异表达及与疾病发生发展的相关性。方法 收集 2019 年 1 月–2020 年 1 月在我院进行常规 HPV 检测者 2983 例, 根据检测结果分为正常组(1222 例, 常规 HPV 检测阴性)、低危 HPV 组(1023 例)、高危 HPV 组(738 例), 比较各组一般临床资料, 对低危 HPV 组和高危 HPV 组患者进行阴道镜检查并进行阴道镜下子宫颈组织活检; 随访 2 年后对低危 HPV 组和高危 HPV 组再次进行检查, 每组根据有无出现子宫颈上皮内瘤变(CIN)分为 CIN 亚组和 non-CIN 亚组。利用反转录–聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 NLRP3 炎症小体相关基因 NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 和 ASC 的 mRNA 表达, 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测其蛋白表达。结果 与正常组比较, 低危 HPV 组和高危 HPV 组 NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但 3 组 ASC 的 mRNA 表达比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 而蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 随访 2 年后, 低危 HPV 组有 409 例发生 CIN, 高危 HPV 组有 421 例发生 CIN, 各组 CIN 组的 NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B 和 ASC 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于 non-CIN 组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 NLRP3 炎症小体可能是 HPV 感染宫颈病变过程中重要的分子事件, NLRP3 炎症小体有可能作为 HPV 感染宫颈病变的预测标志物。

**关键词:** NLRP3; 人乳头瘤病毒; 宫颈病变

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2023.06.025

文章编号: 1006-1959(2023)06-0114-06

## Differential Expression of NLRP3 Inflammasome Gene in HPV-infected Cervical Cells

MAO Huan<sup>1</sup>, PAN Jian-li<sup>2</sup>, WANG Chang-you<sup>1</sup>

(Department of Pathology<sup>1</sup>, Department of General Surgery<sup>2</sup>, People's Hospital of Jizhou District, Tianjin 301900, China)

**Abstract: Objective** To investigate the differential expression of NLRP3 inflammasome-related genes in HPV-infected cervical cells and its correlation with the occurrence and development of the disease. **Methods** A total of 2983 patients who underwent routine HPV test in our hospital from January 2019 to January 2020 were collected. According to the test results, they were divided into normal group (1222 cases, negative for routine HPV test), low-risk HPV group (1023 cases) and high-risk HPV group (738 cases). The general clinical data of each group were compared. The patients in the low-risk HPV group and the high-risk HPV group were examined by colposcopy and cervical biopsy under colposcopy. After 2 years of follow-up, the low-risk HPV group and the high-risk HPV group were examined again. Each group was divided into CIN subgroup and non-CIN subgroup according to the presence or absence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). The mRNA expression of NLRP3 inflammasome-related genes NLRP3, caspase-1, IL-18, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B and ASC was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the protein expression was detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the mRNA and protein expression levels of NLRP3, caspase-1, IL-18, IL-1 $\beta$  and NF- $\kappa$ B in the low-risk HPV group and the high-risk HPV group were increased, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). However, there was a statistically significant difference in the mRNA expression of ASC among the three groups ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference in the protein expression level ( $P>0.05$ ). After 2 years of follow-up, there were 409 cases of CIN in the low-risk HPV group and 421 cases of CIN in the high-risk HPV group. The mRNA and protein expression levels of NLRP3, caspase-1, IL-18, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B and ASC in CIN subgroups were higher than those in non-CIN subgroups, and the differences were statistically significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** NLRP3 inflammasome may be an important molecular event in the process of HPV infected cervical lesions, and NLRP3 inflammasome may be used as a predictive marker for HPV infected cervical lesions.

**Key words:** NLRP3; Human papillomavirus; Cervical lesions

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种常见的性传播病毒, 大多数女性一生中会感染 HPV。HPV 病毒持续感染、病毒载量持续高水平在

宫颈癌癌前病变及病情发展中起重要作用<sup>[1]</sup>。Nod 样受体蛋白 3 (Nod like receptor protein 3, NLRP3) 是广泛存在于肿瘤细胞的炎症小体, 由 NLRP3、含 CARD 结构域的细胞凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing, ASC) 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteine aspartate specific proteinase-1, Caspase-1) 组成, 其效

作者简介: 毛焕(1984.12-), 女, 河南扶沟县人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理学研究

应分子为 IL-18 和 IL-1 $\beta$ 。研究表明<sup>[2]</sup>,炎症小体在多种疾病中扮演重要角色。Takano K 等<sup>[3]</sup>研究发现,NLRP3 在 HPV 感染的口咽鳞状细胞癌中强表达,但 NLRP3 相关炎症蛋白表达与 HPV 感染之间没有相关性。研究发现<sup>[4,5]</sup>,NLRP3 对 HPV 持久性和降低感染高危 HPV 的风险具有显著相关性,然而,NLRP3 炎症小体基因在不同 HPV 感染的子宫颈细胞中的表达是否有差异尚无共识。基于此,本研究探讨 NLRP3 炎症小体相关基因在子宫颈 HPV 感染者中的差异表达,以期对 HPV 感染的宫颈病变的分子生物学研究和内在机制研究提供参考依据。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 1 月-2020 年 1 月在天津市蓟州区人民医院进行常规 HPV 检测者 2983 例,根据检测结果分为正常组(无 HPV 感染,1222 例)、低危 HPV 组(1023 例)、高危 HPV 组(738 例),对低危 HPV 组和高危 HPV 组患者进行阴道镜检查并进行阴道镜下子宫颈组织活检。HPV 分型检测者纳入标准:有性生活史;智力正常;无阴道疾病手术;无子宫颈、子宫和盆腔手术史;无其他肿瘤及免疫性疾病等病史;取材前 3 个月内无子宫颈局部治疗;取材前 24 h 内无阴道冲洗、无阴道内用药、无妇科检查及无性生活。排除标准:近 1 周内使用抗生素;急性生殖道炎症;有子宫颈手术史;月经期、妊娠期、产褥期以及哺乳期;有盆腔放化疗治疗史;生殖道畸形;严重的内科疾病;长期使用免疫抑制剂或皮质类固醇激素。所有入选者年龄 17~81 岁,平均年龄(40.60 $\pm$ 8.70)岁,剔除标本不满意及重复送检者。本研究经医院伦理委员会批准通过,所有患者均知情并签署知情同意书。

## 1.2 方法

1.2.1 HPV 亚型检测 充分暴露子宫颈,用无菌盐水棉球轻轻擦去子宫颈表面分泌物,再使用专用的取样刷在子宫颈外口处以同心圆方式同方向转动 5 圈,采集宫颈脱落上皮细胞标本,立即将收集到的细胞存放于标记有患者相关信息的试管中,置于 4℃ 保存液,密封。在管壁上充分洗脱宫颈刷后挤干,将洗脱液置于 1.5 ml 离心管,12 000 r/min 离心 10 min,去掉上清液后留取管底的细胞沉淀,加 50  $\mu$ l 细胞裂解液,沸水浴加热 10 min。13 000 r/min 离心 10 min,保留上清液以备后面进行 PCR 扩增。取 1  $\mu$ l 作为 DNA 模板,PCR 反应总体系为 25  $\mu$ l,包含:1  $\mu$ l

DNA 模板、PCR-Mix (1 人份用量 19.25  $\mu$ l)、Taq 酶 (1 人份用量 0.75  $\mu$ l)、ddH<sub>2</sub>O (1 人份用量 4  $\mu$ l),其余以双蒸水补充至 25  $\mu$ l。PCR 反应条件:95℃ 预变性 2 min,再 95℃ 中 20 s、55℃ 中 30 s、68℃ 中 20 s,进行 40 个循环。将扩增后的产物于沸水浴中加热变性 10 min,然后进行冰浴,并且固定在有核酸探针的膜固定在杂交仪上进行预杂交,然后将扩增产物加到薄膜上,将样品流入到膜内进行导流杂交,杂交结束后洗去未杂交的 DNA,封闭膜,孵育 5 min,重复进行 2 次,排出封阻液以后在 25℃ 时加入 0.5 ml 酶标液,温育 3.5 min。用冲洗缓冲液彻底洗膜 4 次,0.8 ml/次,除去未结合的酶标液,最后加入 0.5 ml NBT/BCIP 溶液盖上盖板显色 5 min,泵出 NBT/BCIP 溶液并用冲洗缓冲液彻底洗膜 3 次,1 ml/次,再用 2 ml 蒸馏水冲洗,然后关泵,取出杂交膜放在吸水纸上,于 1 h 内分析结果。结果判断:肉眼观察膜条 HPV 分型分布图,根据蓝紫色圆点判断为何种 HPV 感染,若有一个分型点出现蓝紫色则为单一感染,一个以上分型点出现蓝紫色则为多重 HPV 感染。高危型 HPV 感染包括单一高危型 HPV 阳性,高危型和低危型 HPV 同时阳性和多重高危型 HPV 阳性。低危型 HPV 感染为单一低危型 HPV 阳性和多重低危型 HPV 阳性。

1.2.2 阴道镜检查及子宫颈组织活检 受检者于月经干净后 3~7 d 进行阴道镜检查,检查前 24 h 内禁行任何阴道操作(包括冲洗、检查、性生活等)。采用 RCI 评分诊断宫颈病变<sup>[6]</sup>。擦拭子宫颈表面分泌物,调焦后于阴道镜下观察子宫颈表面的颜色、上皮的状态、病变的边缘和血管形态,涂 3%醋酸后观察上皮颜色改变和血管收缩情况,涂碘观察着色情况。每项 0~2 分,4 项得分之和为 RCI 得分,结果:0 分为正常或慢性宫颈炎;1~8 分为子宫颈上皮内瘤变(CIN)。凡 RCI 评分 $\geq$ 1 分者在可疑病变区阴道镜下取活检送病理检查,病理检查由本院病理科完成。

1.2.3 随访 对低危 HPV 和高危 HPV 患者进行 2 年的随访,随访结束后再进行阴道镜检查和子宫颈组织活检,最后结果按是否出现 CIN 再分为 CIN 组和 non-CIN 组。

1.2.4 RT-PCR 检测 NLRP3 及相关基因 mRNA 表达情况 提取子宫颈组织 RNA:将约 0.15 g 的组织样本至液氮中研成粉末,取约 0.1 g 至 1 ml 的 Trizol,摇匀后静置 15 min,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,

除去不溶物后,余下粉末加入0.2 ml蛋白酶裂解液,继续研磨至溶液澄清,4℃14 000 r/min离心5 min取上清,加入200 μl氯仿,剧烈震荡呈乳糜状于37℃静置5 min后放于预冷至4℃的低温离心机,15 000 r/min离心10 min,将无色上清转移至EP管中,加入等量预冷的异丙醇,混匀后室温静置10 min,于4℃的低温离心机,15 000 r/min离心10 min,弃去上清,加入1 ml 85%乙醇,混匀后室温静置5 min,于4℃的低温离心机,15 000 r/min离心5 min,弃去上清,留白色沉淀,待乙醇完全挥发后白色沉淀接近完全透明状,加入50 μl水溶解(无RNA酶),55℃孵育10 min。RNA逆转录合成cDNA:NLRP3炎症小体相关基因逆转录引物序列见表1,在0.2 ml的PCR管中配逆转录反应体系[0.5 μg RNA,Oligo(dT)、PrimeScript RT、Random 6 mers各0.5 μl,5×PrimeScript Buffer 2 μl,加RNaseFree dH<sub>2</sub>O至10 μl],混匀后12 000 r/min离心2 min置于PCR仪上,37℃温浴15 min,85℃加热5 s,稀释至35 μl,得到逆转录的cDNA。PCR总反应体系10 μl,上下游引物各0.4 μl,cDNA 1 μl,DEPC水3.2 μl,SYBR-Green Master Mix 5 μl,95℃预变性60 s,95℃变性15 s,62℃退火15 s,72℃延伸40 s,38个循环,40℃降温10 s。分析RT-PCR结果,计算目的基因的表达水平。目的基因的表达水平为参照内参GAPDH计算所得的相对值,目的基因mRNA表达水平相对值=2<sup>-ΔΔCt</sup>(ΔCt=目的基因Ct值-内参基因Ct值,ΔΔCt=ΔCt实验组样品-ΔCt对照组样品)。

1.2.5 Western blot 检测 NLRP3 相关基因蛋白表达 将子宫颈组织放入研钵中加入液氮研磨至粉末,再加入蛋白裂解液继续研磨成匀浆,4℃12 000 r/min离心10 min获得上清液。经BCA法蛋白浓度测定后将不同样品平衡至同一浓度,再加入等体积的5×SDS上样缓冲液,沸水中煮5 min,立即冰浴5 min,再4℃12 000 r/min离心5 min。取上清进行电泳,

经SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳至溴酚蓝到达胶的底端处停止电泳。再经200 mA恒流转膜1.5 h,将PVDF膜放入5%BSA中室温封闭1 h,弃去封闭液,使用TBST洗膜1次,5 min,将PVDF膜放入5 ml一抗稀释液中,4℃孵育过夜。再用TBST洗膜3次,10 min/次。将ECL均匀的涂在目的条带附近,经暗室压片曝光显影、定影、扫描,最后采用全能型凝胶成像分析系统(Bio-Rad ChemiDoc MP)进行蛋白显影照相,将目的蛋白与内参β-actin灰度值的比值进行半定量分析。

表1 NLRP3炎症小体相关基因引物序列

基因名	编码方向	引物序列
NLRP3	正向引物	CGTGAGTCCCATTAAAGATGGAGT
	反向引物	CCCCACAGTGGATATAGAACAGA
Caspase-1	正向引物	TGTCCTGGGAAGAGGTAGAA
	反向引物	TGCCTGTCTCTGTGATGTGG
ASC	正向引物	CGCGAGGGTCACAAACGT
	反向引物	TGCTCATCCGTCAGGACCTT
IL-18	正向引物	GCTTGAATCTAAATTATCAGTC
	反向引物	GAAGATTCAAATTGCATCTTAT
IL-1β	正向引物	TTACACTGGCAATGAGGATGAC
	反向引物	GAAGATTCAAATTGCATCTTAT
NF-κB	正向引物	CTTCCAAGAAGAGCAGCGTG
	反向引物	TTTCGGTTCACCTCGGCAGAT
GAPDH	正向引物	GCTCTCTGCTCCTCTGTTTC
	反向引物	GTTGACTCCGACCTTCACCT

1.3 统计学方法 实验数据采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验;计数资料采用[n(%)]表示,组间比较采用χ<sup>2</sup>检验,*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组一般资料比较 各组吸烟史、受教育程度、饮酒史、性伴侣、绝经、避孕措施比较,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表2。

表2 各组一般资料比较[ $\bar{x} \pm s, n(\%)$ ]

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )	吸烟史	婚姻(已婚/未婚)	孕次(次)	产次(次)	流产次数(次)	过敏史(有/无)
正常组	1222	40.98±7.64	24.53±2.12	25(2.45)	781/441	1.42±0.56	1.57±0.44	1.28±0.56	134/1088
低危HPV组	1023	40.85±7.92	24.71±1.96	51(4.99)	665/358	1.43±0.53	1.56±0.48	1.29±0.42	123/900
高危HPV组	738	40.63±8.21	24.62±1.85	82(11.11)	450/288	1.44±0.56	1.57±0.46	1.27±0.64	89/649
统计值		<i>F</i> =0.454	<i>F</i> =2.257	χ <sup>2</sup> =68.564	χ <sup>2</sup> =3.145	<i>F</i> =0.311	<i>F</i> =0.160	<i>F</i> =0.299	χ <sup>2</sup> =0.815
<i>P</i>		0.635	0.105	0.000	0.208	0.733	0.853	0.742	0.667

表 2 (续)

组别	n	饮酒史	性伴侣 (≥3/<3,个)	受教育程度 (专科及以上/专科以下)	绝经 (是/否)	避孕措施 (是/否)	初次性生活年龄 (≥23/<23,岁)	首次分娩年龄 (≥26/<26,岁)
正常组	1222	61(4.99)	36/1186	672/550	244/978	733/489	684/538	709/513
低危 HPV 组	1023	92(8.99)	2/1021	327/696	235/788	552/471	552/471	562/461
高危 HPV 组	738	126(17.07)	75/663	303/435	295/443	125/613	376/362	435/303
统计值		$\chi^2=79.450$	$\chi^2=120.894$	$\chi^2=122.726$	$\chi^2=103.012$	$\chi^2=370.023$	$\chi^2=4.682$	$\chi^2=3.390$
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.096	0.183

2.2 各组 NLRP3 炎症小体相关基因 mRNA 和蛋白表达比较 低危 HPV 组和高危 HPV 组 NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1β、NF-κB 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于正常组，差异有统计学意义 ( $P<$

0.05),但 3 组 ASC 的 mRNA 表达比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而蛋白表达水平比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 1、图 2、表 3、表 4。

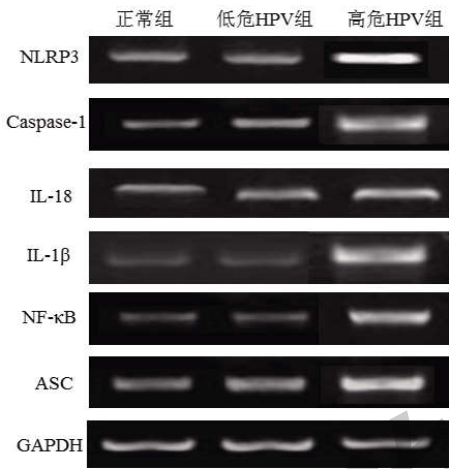


图 1 RT-PCR 检测各组 NLRP3 炎症小体相关基因 mRNA 的表达

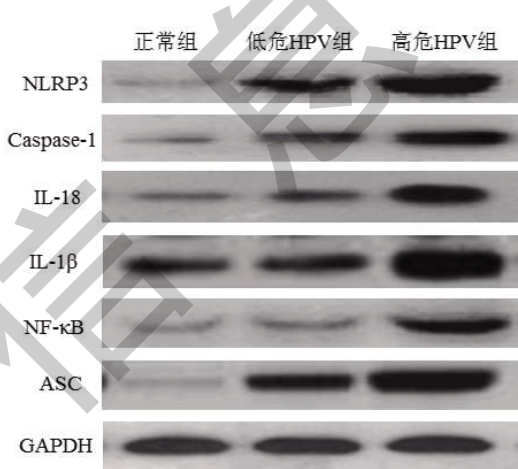


图 2 Western blot 检测各组 NLRP3 炎症小体相关基因蛋白的表达

表 3 各组 NLRP3 炎症小体相关基因 mRNA 的表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	NLRP3	Caspase-1	IL-18	IL-1β	NF-κB	ASC
正常组	1222	0.39±0.26	0.21±0.02	0.25±0.03	0.11±0.04	0.31±0.01	0.11±0.03
低危 HPV 组	1023	0.42±0.23	0.43±0.02	0.59±0.02	0.19±0.04	0.32±0.01	0.32±0.08
高危 HPV 组	738	1.25±0.24	0.63±0.01	0.61±0.03	0.41±0.06	0.53±0.03	0.68±0.01
F		3314.714	2507.368	2965.452	2564.256	2038.695	2684.853
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 各组 NLRP3 炎症小体相关基因蛋白的表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	NLRP3	Caspase-1	IL-18	IL-1β	NF-κB	ASC
正常组	1222	0.29±0.14	0.19±0.03	0.23±0.02	0.19±0.05	0.11±0.07	0.17±0.09
低危 HPV 组	1023	0.86±0.24	0.43±0.01	0.28±0.03	0.24±0.09	0.19±0.09	0.24±0.01
高危 HPV 组	738	1.05±0.23	0.43±0.02	0.31±0.03	0.54±0.01	0.52±0.01	0.66±0.02
F		3648.236	2387.463	2254.675	2895.453	3026.785	3126.458
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 随访结束后 NLRP3 炎症小体相关基因 mRNA 和蛋白的表达情况 低危 HPV 组有 409 例患 CIN, 占 39.98%,高危 HPV 组有 421 例患 CIN,占57.04%。随访结束后对其再次进行 NLRP3 炎症小体相关基

因 mRNA 和蛋白的表达水平分析,结果显示:两组 CIN 组的 NLRP3、Caspase-1、IL-18、IL-1β、NF-κB 和 ASC 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于 non-CIN 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 5、图 3。

表 5 随访结束后低危、高危 HPV 组 NLRP3 炎症小体相关基因 mRNA 和蛋白的表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

相关基因	mRNA/蛋白	低危 HPV 组( $n=1023$ )				高危 HPV 组( $n=738$ )			
		CIN 组( $n=409$ )	non-CIN 组( $n=614$ )	$t$	$P$	CIN 组( $n=421$ )	non-CIN 组( $n=317$ )	$t$	$P$
NLRP3	mRNA	1.21 $\pm$ 0.18	1.08 $\pm$ 0.19	10.946	0.000	1.27 $\pm$ 0.22	1.21 $\pm$ 0.21	4.391	0.000
	蛋白	0.89 $\pm$ 0.22	0.85 $\pm$ 0.21	2.927	0.003	1.16 $\pm$ 0.21	1.04 $\pm$ 0.23	4.876	0.000
Caspase-1	mRNA	0.51 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.02	6.735	0.000	0.54 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.01	6.785	0.000
	蛋白	0.45 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.02	3.884	0.000	0.44 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.02	7.325	0.000
IL-18	mRNA	0.31 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02	3.768	0.000	0.33 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03	8.054	0.000
	蛋白	0.31 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02	4.651	0.000	0.36 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.03	3.262	0.000
IL-1 $\beta$	mRNA	0.21 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	3.216	0.000	0.23 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01	3.875	0.000
	蛋白	0.18 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	3.768	0.000	0.17 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01	3.024	0.000
NF- $\kappa$ B	mRNA	0.33 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.01	4.352	0.000	0.36 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	3.264	0.000
	蛋白	0.31 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	3.878	0.000	0.34 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	2.989	0.000
ASC	mRNA	0.34 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01	4.213	0.000	0.43 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.01	3.341	0.000
	蛋白	0.21 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	3.852	0.000	0.24 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01	2.878	0.000

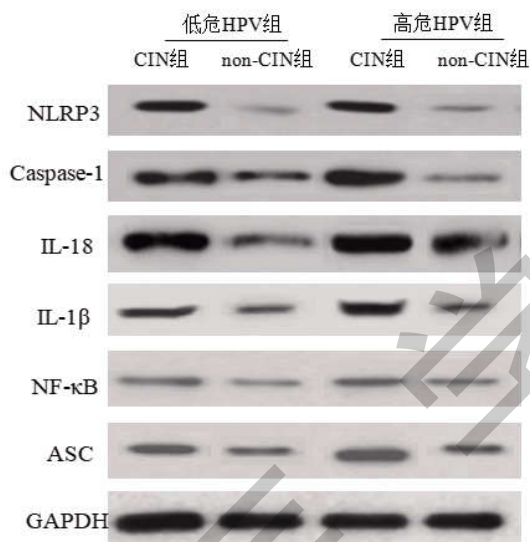


图 3 随访后 Western blot 检测低危、高危 HPV 组 NLRP3 炎症小体相关基因蛋白的表达

### 3 讨论

研究发现<sup>[7,8]</sup>,90%以上的宫颈癌前病变以及宫颈癌患者宫颈组织可检测到 HPV 感染,高危型 HPV 持续感染可导致宫颈上皮细胞异常增殖,促使子宫颈癌前病变甚至宫颈癌的发生。目前临床尚无清除 HPV 的特效药。因此,研究 HPV 感染宫颈细胞的分子生物学行为,对于开发清除 HPV 药物,解除其对宫颈病变的威胁具有重要意义。

子宫颈感染 HPV 后产生炎症是一种保护策略,如果炎症短暂且控制良好则是有益的<sup>[9]</sup>。炎性小体 Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、IL-18 参与机体炎性反应与免疫

应答,诱导细胞焦亡,快速启动诱导抗肿瘤的天然免疫,对抗肿瘤的形成。NLRP3 炎症小体激活能够促进炎症因子及炎症介质的释放,引发炎症反应发生。由于多种类型的病原体和危险信号能够激活 NLRP3 炎症小体,因此它在多种疾病中发挥作用。NLRP3 刺激后通过接头蛋白 ASC 招募 pro-caspase-1 形成炎症小体,活化的 NLRP3 炎症小体可以促进 Caspase-1 的活化,而 Caspase-1 活化后可以切割 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的前体,介导 IL-1 $\beta$  以及 IL-18 的成熟和分泌,进而促进炎症因子的释放,增强炎症反应,发挥对 RNA 和 DNA 病毒强有力的清除作用。有研究认为<sup>[10]</sup>,NLRP3 在宫颈癌中主要通过 ROS 模型激活从而诱导宫颈癌细胞焦亡。另外研究发现宫颈癌细胞较正常宫颈上皮细胞释放的 IL-18、IL-1 $\beta$  多<sup>[11]</sup>。同时也有研究认为当肿瘤进展时,宫颈癌中 IL-1 $\beta$  基因的表达在转录水平被下调,其他重要因子如 IL-18 的表达亦被下调<sup>[12]</sup>。可见前人对于 IL-1 $\beta$  和 IL-18 在宫颈癌中的表达水平研究存在分歧。本研究结果显示,随着子宫颈细胞感染 HPV 危险型别的增加,IL-1 $\beta$  和 IL-18 的 mRNA 和蛋白的表达水平也呈上升趋势。IL-18 可通过经典的炎症小体途径 Caspase-1 对其前体剪切修饰后成熟释放。蒋维等<sup>[13]</sup>研究发现,IL-18 的表达与 HPV 感染和癌症的发生呈正相关,IL-18 分泌量的变化可能在宫颈癌发生发展过程中发挥作用。本研究结果显示,NLRP3 和 Caspase-1 在低危 HPV 组和高危 HPV 组的表达水平呈上升趋势,IL-18 的水平也呈上升趋势,该结

果支持蒋维的观点<sup>[13]</sup>。同时,本研究结果显示,高危 HPV 组随访 2 年后发现有 57.04% 的患者患有 CIN, 而低危 HPV 组有 39.98% 的患者患有 CIN。已有研究认为<sup>[14-16]</sup>, HPV16 持续感染是残留或复发 CIN 的危险因素。宫颈病变甚至宫颈癌的发生是 HPV 高危亚型 16、18 和其它类型的混合感染交织在一起共同作用,很显然,要明确这些不同高危亚型之间的作用关系,需要进一步深入研究。此外,本研究对研究对象进行一般临床资料比较时发现,各组吸烟史、受教育程度、饮酒史、性伴侣、绝经、避孕措施比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。已有研究显示<sup>[17,18]</sup>,在 HPV 感染中与性伴侣的数量、吸烟具有显著相关性。同时也提示不洁性行为对 HPV 的传播具有重大影响,这也已经在有关研究中被报道<sup>[19,20]</sup>。此外,吸烟可能通过激活单核细胞 NLRP3 炎症小体信号通路,促进单核细胞募集,引起血管炎症损伤。

综上所述,NLRP3 炎症小体相关基因的异常表达可能是 HPV 感染子宫颈细胞发生病变的关键因素,有可能作为 HPV 感染子宫颈细胞发生病变的预测标志物。

#### 参考文献:

- [1] 张秀艳,纪利娜,梁紫影,等.V81T 细胞和 TINs 细胞表达情况与宫颈癌患者临床分期及预后的关系[J]. 免疫学杂志, 2021,37(1):67-72.
- [2] Huang Y,Xu W,Zhou R.NLRP3 inflammasome activation and cell death[J].Cell Mol Immunol,2021,18(9):2114-2127.
- [3] Takano K,Kondo A,Kurose M,et al.Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma[J].Otorhinolaryngol,2016,77:98-104.
- [4] Pontillo A,Blicher P,Leal VNC,et al.Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development[J].J Med Virol,2016,88(9):1646-1651.
- [5] Wu XX,Zhang HY,Qi W,et al.Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3 mediated endothelial cell pyroptosis[J].Cell Death Dis,2018,9(2):171.
- [6] 杨小飞,谢宁娜,宋淑芳.内蒙中部地区妇科门诊就诊患者宫颈 HPV 感染及与宫颈病变相关性的研究[J]. 现代妇产科进展,2018,27(6):446-451.
- [7] Jr WS,Bacon MA,Bajaj A,et al.Cervical cancer:A global health crisis[J].Cancer,2017,123(13):2404-2412.
- [8] Berman TA,Schiller JT.Human papillomavirus in cervical

cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases[J]. Cancer,2017,123(12):2219-2229.

[9] Nahand JS,Moghoofei M,Salmaninejad A,et al.Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review [J].Int J Cancer,2020,146(2): 305-320.

[10] Hoseini Z,Sepahvand F,Rashidi B,et al.NLRP3 inflammasome:Its regulation and involvement in atherosclerosis [J].J Cell Physiol,2018,233(3):2116-2132.

[11] 赵子龙,周国江,任玉峰,等.IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 的表达和 HPV 感染与宫颈癌的相关性研究[J].实用癌症杂志,2017,32 (3):358-360.

[12] 张庆云,王莹,陈小江.宫颈癌术后感染状况及其与 Caspase-1、IL-1 $\beta$  表达情况的相关性 [J]. 实用癌症杂志,2021,36 (3):423-425.

[13] 蒋维,徐建青,周芮.宫颈癌患者高危型 HPV 感染状况及与 Caspase-1 和 IL-1 $\beta$  表达的相关性[J].中国妇幼保健,2021,36 (10):2363-2366.

[14] Bruno MT,Cassaro N,Garofalo S,et al.HPV16 persistent infection and recurrent disease after LEEP [J].Virol J,2019,16(1): 148.

[15] 陈晴,杜辉,王纯,等.阴道镜下隐匿子宫颈上皮内瘤变Ⅲ级病变的 HPV 亚型感染特征及鳞状上皮厚度分析[J].中华妇产科杂志,2018,53(3):172-177.

[16] 张磊,毕庆庆,陈文,等.宫颈上皮内瘤变和宫颈癌患者人乳头瘤病毒基因型流行率和归因分析[J].中国全科医学,2019,22 (17):2042-2046.

[17] 周方芳,桂涛,黄美华,等.宫颈高危型人乳头状瘤病毒感染中医证型、体质分布及相关危险因素的研究[J].实用医学杂志,2022,38(2):234-238.

[18] Torres -Poveda K,Ruiz -Fraga I,Madrid -Marina V,et al. High risk HPV infection prevalence and associated cofactors: a population-based study in female ISSSTE beneficiaries attending the HPV screening and early detection of cervical cancer program[J].BMC Cancer,2019,19(1):1205.

[19] 岳帆,侯向萍,咸敏,等.6620 例已婚妇女 HPV 感染现状及影响因素分析 [J]. 分子诊断与治疗杂志,2022,14 (3):512-515,520.

[20] Kero K, Rautava J.HPV Infections in Heterosexual Couples: Mechanisms and Covariates of Virus Transmission[J].Acta Cytol, 2019,63(2):143-147.

收稿日期:2022-05-23;修回日期:2022-07-12

编辑/成森