

• 论 著 •

# NOD2 受体在抗 $\beta_2$ GP I 抗体诱导血小板炎性反应促血栓形成中的作用研究\*

骆 杰<sup>1</sup>, 查才军<sup>2</sup>, 张 平<sup>3</sup>, 王兆鑫<sup>2</sup>, 吴 言<sup>4</sup>, 张文静<sup>2△</sup>

1. 同济大学附属第十人民医院检验医学科, 上海 200072; 哈尔滨医科大学附属第二医院:  
2. 检验医学科; 3. 神经外科; 4. 超声医学科, 黑龙江哈尔滨 150086

**摘 要:**目的 明确核苷酸结合寡聚域 2(NOD2)受体在抗  $\beta_2$  糖蛋白 I 抗体(anti- $\beta_2$ GP I)诱导血小板炎性反应,进而促血栓形成中的作用机制,探讨以 NOD2 受体为干预靶点对 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的相关血栓形成机制的影响。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2021 年 3 月哈尔滨医科大学附属第二医院经 CT、MRI 或动静脉造影诊断为血栓且 anti- $\beta_2$ GP I 阳性的患者 69 例为血栓组;选取同期体检健康者 78 例作为健康对照组。分别提取血栓患者、健康对照者的血小板和血浆,其中健康对照者血小板需与 anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I 共孵育。利用实时定量 PCR(RT-PCR)检测 NOD2 受体 mRNA 表达;ELISA 检测白细胞介素(IL)-1 $\beta$  水平;免疫印迹法(Western blot)检测 Toll 样受体 4(TLR4)、NOD2 受体、p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活化情况;FeCl<sub>3</sub> 诱导小鼠颈总动脉血栓形成,利用激光散斑超声血流仪监测血管闭塞时间。**结果** 与健康对照组相比,血栓组患者血小板 NOD2 受体 mRNA 表达和血浆 IL-1 $\beta$  水平显著增加( $P<0.05$ );anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I 刺激后血小板 NOD2 受体 mRNA 表达增加,刺激后上清液 IL-1 $\beta$  水平显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与 anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I 刺激后相比,加入 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 后,IL-1 $\beta$  水平显著降低;TLR4 抑制剂 TAK242 可部分抑制 NOD2 受体蛋白表达,显著抑制 p38 MAPK 磷酸化和 IL-1 $\beta$  水平;姜黄素可使 p38 MAPK 磷酸化及 IL-1 $\beta$  水平下降;向小鼠体内注射姜黄素可使 anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I 诱导的血栓形成时间显著延长。**结论** anti- $\beta_2$ GP I 可通过 TLR4 调控 NOD2 受体/p38 MAPK 信号轴影响 IL-1 $\beta$  释放,姜黄素可通过抑制 NOD2 受体表达,降低 p38 MAPK 磷酸化及 IL-1 $\beta$  水平,减缓 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的炎性反应和血栓形成,有望为 anti- $\beta_2$ GP I 阳性血栓患者治疗提供新思路。

**关键词:**核苷酸结合寡聚域 2 受体; 抗  $\beta_2$  糖蛋白 I 抗体; 炎性反应; 血栓; 姜黄素

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2022.04.004 **中图法分类号:**R446.1

**文章编号:**1673-4130(2022)04-0398-06 **文献标志码:**A

## Role of NOD2 receptor for promoting thrombosis in platelet inflammatory response induced by anti- $\beta_2$ GP I antibody\*

LUO Jie<sup>1</sup>, ZHA Caijun<sup>2</sup>, ZHANG Ping<sup>3</sup>, WANG Zhaoxin<sup>2</sup>, WU Yan<sup>4</sup>, ZHANG Wenjing<sup>2△</sup>

1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Department of Laboratory Medicine; 3. Department of Neurosurgery; 4. Department of Ultrasound Medicine, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China

**Abstract: Objective** To clarify the mechanism of nucleotide-binding oligomerization-2 (NOD2) receptor in anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibody (anti- $\beta_2$ GP I)-induced platelet inflammatory and thus promoting thrombosis, and to explore the effect of NOD2 receptor as an intervention target on anti- $\beta_2$ GP I induced related thrombosis. **Methods** Sixty-nine patients with thrombus and anti- $\beta_2$ GP I positive diagnosed by CT, MRI or arteriovenous angiography in the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University from January 2018 to March 2021 were selected as the thrombus group. Contemporaneous healthy subjects undergoing physical examination were selected as the healthy control group. Platelet and plasma were extracted from the patients with thrombus and healthy controls, and platelets from healthy controls were co-incubated with anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I. The real-time PCR was used to detect the expression of NOD2 receptor mRNA. The IL-1 $\beta$  level was detected by ELISA. Toll-like receptor 4 (TLR4), NOD2 receptor and p38 mitogen-activated protein kinase ac-

\* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(82001715);黑龙江省卫生和计划生育委员会科研课题(2018286);黑龙江省省属高校基本科研业务费科研项目(2017LCZX67)。

作者简介:骆杰,男,医师,主要从事自身免疫和血栓性疾病研究。△ 通信作者, E-mail: wenjingzhang@hrbmu.edu.cn。

本文引用格式:骆杰,查才军,张平,等. NOD2 受体在抗  $\beta_2$ GP I 抗体诱导血小板炎性反应促血栓形成中的作用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(4): 398-403.

tivation (MAPK) were detected by Western blot. FeCl<sub>3</sub> induced the formation of common carotid artery thrombosis in mice, and the time of vascular occlusion was monitored by laser speckled ultrasonic flowmeter.

**Results** Compared with the healthy control group, the platelet NOD2 receptor mRNA expression and plasma IL-1 $\beta$  level in the thrombus group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). After anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I stimulation, the expression of platelet NOD2 receptor mRNA was increased, the level of IL-1 $\beta$  in stimulated supernatant was significantly increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I stimulation, the level of IL-1 $\beta$  was significantly decreased after the adding the p38 MAPK inhibitor SB203580. TLR4 inhibitor TAK242 could partially inhibit NOD2 receptor protein expression, significantly inhibited the p38 MAPK phosphorylation and IL-1 $\beta$  level. Curcumin could decrease p38 MAPK phosphorylation and IL-1 $\beta$  level. Injecting curcumin into mice significantly prolonged the time of anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I-induced thrombosis. **Conclusion** Anti- $\beta_2$ GP I can influence IL-1 $\beta$  release through TLR4 regulating NOD2 receptor /p38 MAPK signaling axis. Curcumin can reduce p38 MAPK phosphorylation and IL-1 $\beta$  level by inhibiting NOD2 receptor expression, and alleviate anti- $\beta_2$ GP I-induced inflammatory response and thrombosis, which is expected to provide a new idea for the treatment of the patients with anti- $\beta_2$ GP I positive thrombus.

**Key words:** nucleotide-binding oligomerization-2 receptor; anti- $\beta_2$  glycoprotein I antibody; inflammatory response; thrombus; curcumin

抗  $\beta_2$  糖蛋白 I 抗体 (anti- $\beta_2$ GP I) 属于抗磷脂抗体家族成员, 是血栓发生、发展过程中起免疫调节作用的高危因素, 但其调控血栓形成的机制目前尚不明确。以往的研究表明, anti- $\beta_2$ GP I 与其靶抗原  $\beta_2$ GP I 结合形成 anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I 复合物后, 通过诱导血小板功能紊乱可使机体处于血栓前状态, 造成血栓形成前的第 1 次“打击”; 血栓前状态发生之后, anti- $\beta_2$ GP I 诱导细胞发生炎症反应促发第 2 次“打击”, 最终导致血栓形成, 提示炎症反应可能在 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的血栓形成中扮演了重要角色<sup>[1]</sup>。核苷酸结合寡聚域 2 (NOD2) 受体是炎症小体家族成员之一, 可表达于血小板细胞的细胞质中, 研究表明 NOD2 受体可通过调节氧化应激反应促使神经细胞功能紊乱、促发并加重动脉粥样硬化<sup>[2]</sup>。本研究旨在明确 NOD2 受体在 anti- $\beta_2$ GP I 诱导血小板发生炎症反应进而促血栓形成中的作用机制, 探讨以 NOD2 受体为干预靶点对 anti- $\beta_2$ GP I 诱导血栓形成的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2018 年 1 月至 2021 年 3 月哈尔滨医科大学附属第二医院经 CT、MRI 或动静脉造影诊断为血栓且 anti- $\beta_2$ GP I 阳性的患者 69 例为血栓组。排除标准: 合并肝脏、肾脏等严重基础疾病; 合并凝血功能障碍疾病或血液疾病; 合并其他自身免疫性疾病、恶性肿瘤等。随机选取同期常规体检的 78 例健康者作为健康对照组。本研究通过医院伦理委员会审核批准, 所有研究对象均知情同意。

**1.2 仪器与试剂** 小鼠抗人 NOD2 抗体, p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 抗体、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  抗体 (美国 Cell signaling 公司), IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (上海博奥公司), cDNA 反转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), PCR 试剂盒 (Roche 公司)。NOD2 引物 (上海捷瑞公司), 姜黄素 (山西玉宁生物科技有限公司), SB203580、TAK242、 $\beta$ -actin (上海碧云天公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 临床数据收集** 收集所有入组人员的性别、年龄资料; 生化检测指标: 丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶、碱性磷酸酶、总蛋白、清蛋白、球蛋白、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、胆碱酯酶、尿素、肌酐、尿酸、葡萄糖、总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇 (Roche DPP 生化分析仪); 白细胞计数、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数、单核细胞计数、血红蛋白、红细胞计数、血小板计数 (Sysmex XE5000 血细胞分析仪)。

**1.3.2 血小板与血浆提取** 收集血栓患者和健康者肘正中静脉采集的枸橼酸钠抗凝全血标本, 室温 160 $\times$ g 离心 10 min, 提取上清液, 2 300 $\times$ g 离心 10 min 后分离上清液与沉淀, 沉淀重悬于 Tyrode's 缓冲液, 上清液于 -20 $^{\circ}$ C 冻存, 备用<sup>[14]</sup>。根据实验需要, 将分离后的健康者血小板分为阴性对照组、anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I 刺激组、anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I 加 Toll 样受体 4 (TLR4) 抑制剂 TAK242 组 (anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I + TAK242 组)、anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I 加 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 组 (anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I + SB203580 组) 和 anti- $\beta_2$ GP I / $\beta_2$ GP I + 姜黄素组。

**1.3.3 实时定量 PCR (RT-PCR)** 提取的血小板悬液中加入 1 mL Trizol 试剂, 室温静置 5 min 后加入 200  $\mu$ L 氯仿, 涡旋振荡器上充分振荡混匀后室温下静置 3 min, 12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液, 加入异丙醇 500  $\mu$ L, 室温静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液。紫外分光光度计检测沉淀中总 RNA 水平。Trans Ciptor First Strand cDNA Synt hesis Kit 反转录合成 cDNA。加入 NOD2 引物, 以  $\beta$ -actin 为内参, 根据 Ct 值计算  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

**1.3.4 ELISA** 收集患者或健康人血浆, 以及刺激血小板后的上清液, 加入 ELISA 试剂盒检测孔中, 加样量为 50  $\mu$ L。按照试剂盒说明书加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min。清洗

液洗涤 5 次后,分别加入底物 A 液和 B 液各 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 避光水浴 15 min,终止反应。酶标仪在波长 450 nm 处检测样品 A 值。以标准品水平绘制标准曲线,计算 IL-1 $\beta$  水平。

**1.3.5 免疫印迹法(Western blot)** 血小板经 PIPA 裂解后离心提取总蛋白,BCA 法检测蛋白水平。配制 10%分离胶,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。200 V 恒压转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入小鼠抗人  $\beta$ -actin、TLR4、NOD2、ASK-1、p38 MAPK 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗小鼠二抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,增强化学发光(ECL)显影。

**1.3.6 小鼠颈总动脉血栓模型** 将小鼠分为阴性对照组、anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I 注射组和 anti- $\beta_2$ GP I/ $\beta_2$ GP I +姜黄素注射组。小鼠尾静脉注射各组药物,4%水合氯醛(40 mg/kg)腹腔麻醉小鼠,仰卧固定,75%乙醇消毒,于颈正中line做纵向切口。钝性分离小鼠颈部肌肉组织,暴露左侧颈总动脉,长度约为 5 mm。用棉球擦干颈动脉周围残留血液,于近心端和远心端分别放置两根结扎线,并在动脉下放置一块塑料薄膜(5 mm $\times$ 30 mm)用于保护血管周围组织。将

吸有 10  $\mu$ L 10% FeCl<sub>3</sub> 的 1 M 滤纸片(3 mm $\times$ 3 mm)放置于动脉下,连续刺激并观察 10 min。

**1.3.7 激光散斑超声血流分析** 将激光散斑超声血流分析仪激光斑点对准分离出的小鼠颈总动脉,稳定 1 min 后,利用 PIMSoft 软件监测血流变化情况。以血管内持续 2 min 无血流通过作为动脉闭塞标志。

**1.4 统计学处理** 应用 GraphPad Prism version 4.22 统计软件进行分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;非正态分布的计量资料以 *M*(*P*<sub>25</sub>,*P*<sub>75</sub>)表示,组间比较采用秩和检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 两组一般资料比较** 对比健康对照组和血栓组的一般临床资料,两组研究对象血清尿酸、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、球蛋白、直接胆红素、胆碱酯酶、血红蛋白水平、淋巴细胞计数、单核细胞计数、红细胞计数和血小板计数差异无统计学意义(*P*>0.05);白细胞计数、中性粒细胞计数等差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。半数以上患者(57.97%)血清葡萄糖水平超过正常参考范围(未在表 1 中体现)。

表 1 两组研究对象一般资料比较

| 项目                                                                                        | 血栓组( <i>n</i> =69) | 健康对照组( <i>n</i> =78) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|
| 性别[ <i>n</i> (%)]                                                                         |                    |                      |
| 男                                                                                         | 30(43.5)           | 26(33.3)             |
| 女                                                                                         | 39(56.5)           | 52(66.7)             |
| 年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)                                                                    | 57.17 $\pm$ 1.78   | 43.62 $\pm$ 1.27     |
| 丙氨酸氨基转移酶[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),U/L]               | 18.0(12.0,21.0)*   | 12.5(10.0,16.0)      |
| 天门冬氨酸氨基转移酶[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),U/L]             | 20(15,28)*         | 16(14,18)            |
| $\gamma$ -谷氨酰转移酶[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),U/L]       | 26(15,46)*         | 16(12,21)            |
| 碱性磷酸酶[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),U/L]                  | 81.0(71.0,129.0)*  | 67.5(54.0,81.0)      |
| 总蛋白( $\bar{x}\pm s$ ,g/L)                                                                 | 70.69 $\pm$ 6.75*  | 74.67 $\pm$ 4.00     |
| 清蛋白( $\bar{x}\pm s$ ,g/L)                                                                 | 41.14 $\pm$ 4.18*  | 46.38 $\pm$ 2.59     |
| 球蛋白( $\bar{x}\pm s$ ,g/L)                                                                 | 29.55 $\pm$ 5.19   | 28.29 $\pm$ 4.00     |
| 总胆红素[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\mu$ mol/L]          | 14.8(11.9,20.3)*   | 10.8(8.4,14.1)       |
| 直接胆红素[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\mu$ mol/L]         | 3.6(2.8,4.8)       | 4.4(3.4,5.8)         |
| 间接胆红素[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\mu$ mol/L]         | 11.7(8.4,20.7)*    | 6.5(4.7,8.9)         |
| 胆碱酯酶[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),U/L]                   | 7 728(6 814,9 544) | 8 433(7 473,9 269)   |
| 尿素( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)                                                               | 5.41 $\pm$ 1.91*   | 4.67 $\pm$ 1.10      |
| 肌酐[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\mu$ mol/L]            | 73(62,93)*         | 67(59,78)            |
| 尿酸( $\bar{x}\pm s$ , $\mu$ mol/L)                                                         | 298.86 $\pm$ 89.68 | 276.78 $\pm$ 69.81   |
| 葡萄糖[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),mmol/L]                 | 6.41(5.18,8.53)*   | 4.98(4.69,5.22)      |
| 总胆固醇( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)                                                             | 4.35 $\pm$ 1.06    | 4.33 $\pm$ 0.53      |
| 三酰甘油[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),mmol/L]                | 1.47(1.13,2.23)*   | 0.87(0.70,1.17)      |
| 高密度脂蛋白胆固醇( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)                                                        | 1.09 $\pm$ 0.31*   | 1.46 $\pm$ 0.32      |
| 低密度脂蛋白胆固醇( $\bar{x}\pm s$ ,mmol/L)                                                        | 2.38(1.97,3.18)    | 2.49(2.15,2.77)      |
| 白细胞计数[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\times 10^9$ /L]    | 7.7(6.1,10.4)*     | 5.8(5.0,6.7)         |
| 中性粒细胞计数[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\times 10^9$ /L]  | 5.16(3.96,7.71)*   | 3.42(2.80,4.15)      |
| 淋巴细胞计数( $\bar{x}\pm s$ , $\times 10^9$ /L)                                                | 1.84 $\pm$ 0.76    | 2.02 $\pm$ 0.47      |
| 单核细胞计数[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\times 10^9$ /L]   | 0.31(0.21,0.42)    | 0.30(0.25,0.40)      |
| 血红蛋白[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ),g/L]                   | 139.0(130.0,153.0) | 135.5(129.0,147.0)   |
| 红细胞计数[ <i>M</i> ( <i>P</i> <sub>25</sub> , <i>P</i> <sub>75</sub> ), $\times 10^{12}$ /L] | 4.51(4.29,4.76)    | 4.46(4.24,4.79)      |
| 血小板计数( $\bar{x}\pm s$ , $\times 10^9$ /L)                                                 | 226.91 $\pm$ 92.49 | 251.18 $\pm$ 54.58   |

注:与健康对照组比较,\**P*<0.05。

**2.2 健康对照组与血栓组外周血小板 NOD2 受体 mRNA 表达和血浆 IL-1 $\beta$  水平比较** 与健康对照组相比,血栓组患者血小板 NOD2 受体 mRNA 表达和血浆 IL-1 $\beta$  水平显著升高( $P<0.05$ )。见图 1。

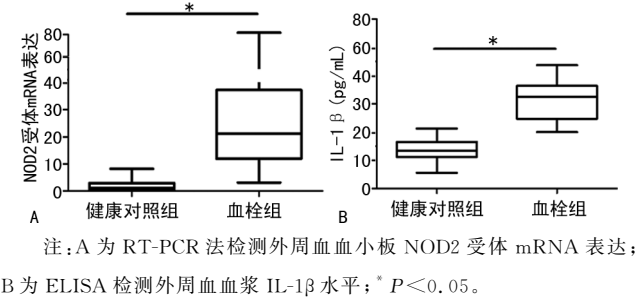


图 1 两组外周血小板 NOD2 受体 mRNA 表达和血浆 IL-1 $\beta$  水平比较

**2.3 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 对健康人血小板 NOD2 受体 mRNA 表达及 IL-1 $\beta$  水平的影响** 与阴性对照组相比,anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 刺激组血小板 NOD2 受体 mRNA 表达增加( $P<0.05$ ),复合物刺激血小板后上清液 IL-1 $\beta$  水平显著升高( $P<0.05$ )。见图 2。

**2.4 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 通过 TLR4 调控 NOD2/ p38 MAPK 通路影响血小板释放 IL-1 $\beta$**  与 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 刺激组相比,TLR4 抑制剂 TAK242 可部分抑制 NOD2 受体蛋白表达,显著抑制 p38 MAPK 磷酸化和降低 IL-1 $\beta$  水平;加入 NOD2 受体抑制剂姜黄素后,p38 MAPK 磷酸化受到抑制,IL-1 $\beta$  水平下降;加入 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 后,IL-1 $\beta$

水平显著降低,NOD2 受体表达未受影响。见图 3。

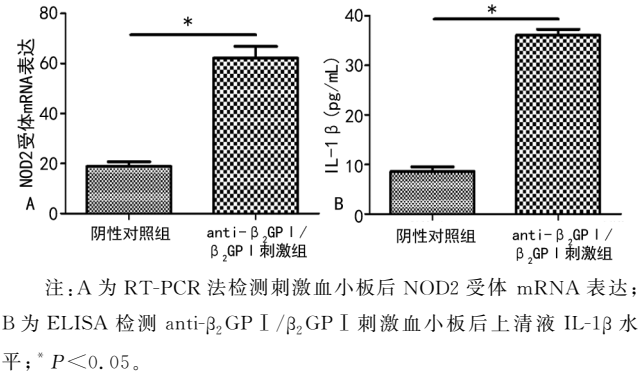


图 2 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 刺激后健康人血小板 NOD2 受体 mRNA 表达及上清液 IL-1 $\beta$  水平比较

**2.5 姜黄素通过抑制 NOD2 受体缓解 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 刺激后的小鼠颈总动脉血栓形成** anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 注射组小鼠颈总动脉闭塞时间缩短,注射姜黄素可使 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 诱导的血管闭塞时间显著延长。见图 4。

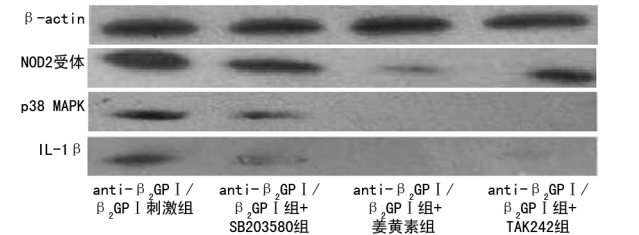
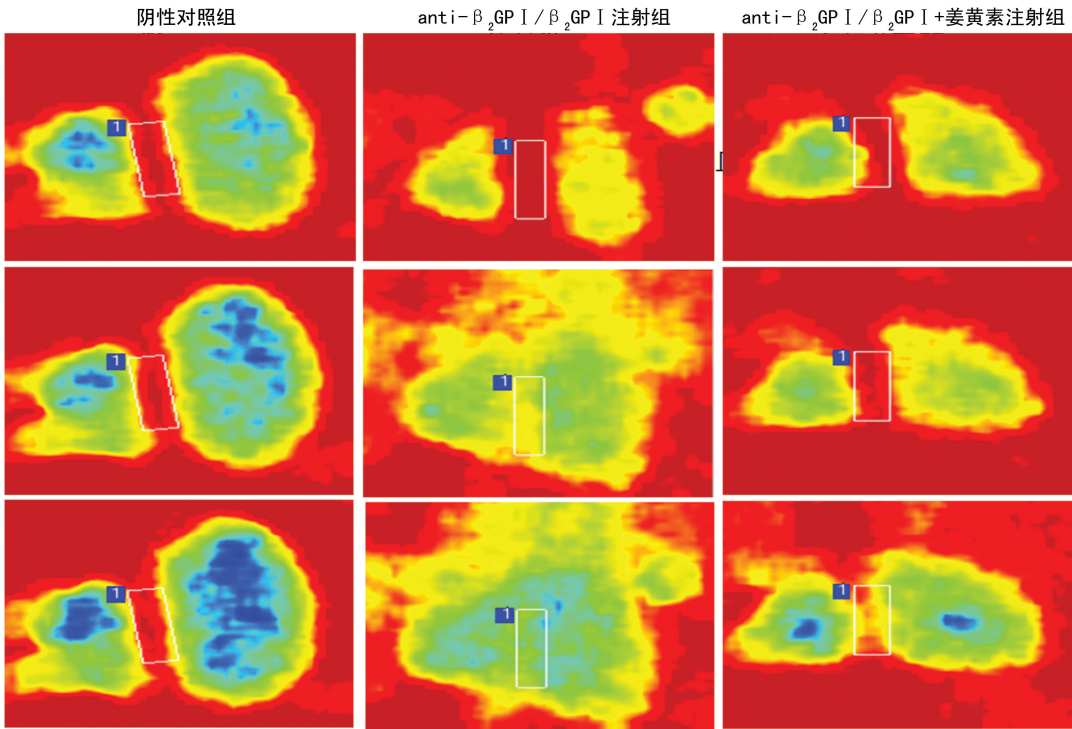


图 3 Western blot 检测血小板 NOD2 受体、p38 MAPK 和 IL-1 $\beta$  表达



注:白色方框内为小鼠颈总动脉,其中黑色为血管血流充盈状态,灰色为血管缺血状态。

图 4 激光散斑超声血流分析仪监测 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 刺激后小鼠颈总动脉血流

### 3 讨 论

anti- $\beta_2$ GP I 是导致抗磷脂综合征 (APS) 患者血栓形成的高危因素, APS 患者外周血内皮细胞黏附分子-1、组织因子、肿瘤坏死因子- $\alpha$  水平增高, 提示 APS 患者体内细胞发生了促炎表型转变<sup>[3-4]</sup>。血小板活化是血栓形成的始动因素, 近年来, 血小板在炎症相关免疫反应中的重要作用逐渐得到重视<sup>[5-6]</sup>。

NOD2 受体是一种模式识别受体, 对自身免疫性疾病和炎性疾病具有调节作用<sup>[7-8]</sup>。NOD2 受体可通过 N 末端天氨酸酶募集区域, 调节巨噬细胞对低密度脂蛋白的摄取, 促使动脉粥样硬化斑块中富脂质层面积增加, 导致小鼠动脉粥样硬化斑块形成和脑血栓形成。以上机制揭示了其在血栓性疾病发病机制中具有重要作用<sup>[2,9-10]</sup>。IL-1 $\beta$  是参与多种疾病发生、发展的急性炎症因子, 与深静脉血栓、脑梗死和冠状动脉硬化性心脏病等多种血栓性疾病发生密切相关<sup>[11-12]</sup>。本研究中, 与健康人相比, anti- $\beta_2$ GP I 阳性的血栓患者血小板 NOD2 受体 mRNA 表达、血浆 IL-1 $\beta$  水平升高, 提示血小板炎性反应可能参与 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的血栓形成。

对比入组患者和健康人数据时发现, 两组人群的血清葡萄糖和三酰甘油水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 半数以上患者 (57.97%) 血清葡萄糖水平超过正常参考范围却没有明确的糖尿病史或现病史, 分析后发现多数患者为非空腹采血。为了进一步排除潜在危险因素及血栓形成过程对血小板的干扰作用, 本研究利用  $\beta_2$ GP I 抗原抗体复合物对健康人血小板进行体外刺激<sup>[13]</sup>。与临床分析结果相似,  $\beta_2$ GP I 抗原抗体复合物刺激后血小板 NOD2 受体 mRNA 表达、上清液 IL-1 $\beta$  水平升高, 证实 anti- $\beta_2$ GP I 可以促使血小板发生炎性反应。

从机制上来讲, NOD2 受体活化需有跨膜受体进行信号传递。研究表明, TLR4 和 NOD2 受体在调节巨噬细胞信号转导和炎症因子释放过程中具有协同作用<sup>[14]</sup>。然而, 另有研究发现, 单核细胞 NOD2 受体能够调节 p62 蛋白表达, 通过诱导 MyD88 聚集、下调 MyD88-TRAF 复合物形成, 抑制 TLR4 信号瀑布调节的炎症因子产生<sup>[15-16]</sup>。这提示 NOD2 受体与 TLR4 可能存在正/负反馈作用, 在不同细胞系或不同刺激剂诱导下, 二者相互作用不同。前期研究表明, anti- $\beta_2$ GP I 可激活血小板 TLR4, 促使血小板活化, 发挥凝血功能<sup>[13]</sup>。本研究发现抑制 TLR4 可部分降低 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的 NOD2 受体表达, 提示 TLR4 和 NOD2 受体在 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的炎症因子释放过程中起到协同作用, NOD2 受体受 TLR4 调控。

姜科姜黄属植物根茎提取物姜黄素具有抗炎、抗

氧化、抗病毒、抗肿瘤等药理活性<sup>[17]</sup>。研究表明, 姜黄素可降低肿瘤坏死因子- $\alpha$  和 IL-6 等促炎因子表达<sup>[18]</sup>。姜黄素还可通过 MAPK 和核因子 (NF)- $\kappa$ B 途径抑制内皮细胞、单核细胞和中性粒细胞活化, 减少黏附分子和趋化因子的表达, 抑制炎症反应<sup>[19]</sup>。本研究中, 姜黄素可通过抑制血小板 NOD2 受体活化, 进而下调 p38 MAPK 磷酸化水平, 导致 IL-1 $\beta$  分泌减少; 向注射了 anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I 的小鼠体内注入姜黄素, 可显著延长 FeCl<sub>3</sub> 刺激后血管内血栓形成时间。这表明姜黄素可以通过调控 NOD2 受体减轻血小板炎性反应, 进而减缓 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的血栓形成。

anti- $\beta_2$ GP I 可通过 NOD2 受体/p38 MAPK 信号轴调控 IL-1 $\beta$  释放, TLR4 在其中起到一定的调控作用。姜黄素可通过抑制 NOD2 受体, 降低 p38 MAPK 磷酸化及 IL-1 $\beta$  水平, 减缓 anti- $\beta_2$ GP I 诱导的血小板炎性反应和血栓形成。本研究结果有望为 anti- $\beta_2$ GP I 阳性血栓患者治疗提供新思路。

### 参考文献

- [1] BONTADI A, RUFFATTI A, GIANNINI S, et al. In vitro effect of anti- $\beta_2$  Glycoprotein I antibodies on P-selectin expression, a marker of platelet activation[J]. Reumatismo, 2012, 64(1): 35-39.
- [2] LIU H Q, WEI X B, KONG L J, et al. NOD2 is Involved in the inflammatory response after cerebral ischemia-reperfusion Injury and triggers NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(5): 525-535.
- [3] DAVID G, DORUK E. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndroms[J]. N Engl J Med, 2018, 378: 2010-2021.
- [4] LIU T, GU J, WAN L, et al. Anti- $\beta_2$ GP I domain 1 antibodies stratify high risk of thrombosis and late pregnancy morbidity in a large cohort of Chinese patients with antiphospholipid syndrome[J]. Thromb Res, 2020, 185: 142-149.
- [5] DELANEY C, DAVIZON-CASTILLO P, ALLAWZI A, et al. Platelet activation contributes to hypoxia-induced inflammation[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 320(3): L413-L421.
- [6] JEONG Y H, TANTRY U S, MIN J H, et al. Influence of platelet reactivity and inflammation on peri-procedural myonecrosis in East Asian patients undergoing elective percutaneous coronary intervention [J]. Int J Cardiol, 2013, 168(1): 427-435.
- [7] OPITZ B, PÜSCHEL A, SCHMECK B, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae

- [J]. J Biol Chem, 2004, 279(35): 36426-36432.
- [8] ZHAO L, KWON M J, HUANG S, et al. Differential modulation of Nods signaling pathways by fatty acids in human colonic epithelial HCT 116 cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282: 11618-11628.
- [9] LIU H Q, ZHANG X Y, EDFELDT K, et al. NOD2-mediated innate immune signaling regulates the eicosanoids in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(9): 2193-2201.
- [10] LEVINE S R, BREY R L, TILLEY B C, et al. APASS investigators antiphospholipid antibodies and subsequent thrombo-occlusive events in patients with ischemic stroke[J]. JAMA, 2004, 291(5): 576-584.
- [11] RIDKER P M, MACFADYEN J G, TOM T, et al. Residual inflammatory risk associated with interleukin-18 and interleukin-6 after successful interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab; further rationale for the development of targeted anti-cytokine therapies for the treatment of atherothrombosis[J]. Eur Heart J, 2020, 41(23): 2153-2163.
- [12] EVERETT B M, MACFADYEN J G, THUREN T, et al. Inhibition of interleukin-1 $\beta$  and reduction in atherothrombotic cardiovascular events in the CANTOS trial[J]. J Am College Cardiol, 2020, 76(14): 1660-1670.
- [13] ZHANG W J, ZHA C J, LU X M, et al. Anti- $\beta_2$ GP I /  $\beta_2$ GP I complexes induce platelet activation and promote thrombosis via p38MAPK; a pathway to targeted therapies[J]. Front Med, 2019, 13(6): 680-689.
- [14] KIM H, ZHAO Q, ZHENG H, et al. A novel crosstalk between TLR4- and NOD2-mediated signaling in the regulation of intestinal inflammation[J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 12018.
- [15] STROBER W, KITANI A, FUSS I, et al. The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease[J]. Mucosal Immunol, 2008(1): S5-S9.
- [16] PARK S, HA S D, COLEMAN M, et al. p62/SQSTM1 enhances NOD2-mediated signaling and cytokine production through stabilizing NOD2 oligomerization[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57138.
- [17] MARTON L T, BARBALHO S M, SLOAN K P, et al. Curcumin, autoimmune and inflammatory diseases: going beyond conventional therapy: a systematic review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020(2): 1-19.
- [18] JIANG S, HAN J, LI T, et al. Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases[J]. Pharmacol Res, 2017, 119: 373-383.
- [19] KOYA T, MIYAZAKI T, WATANABE T, et al. Salusin- $\beta$  accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- $\kappa$ B signaling in LDL receptor-deficient mice in vivo and HUVECs in vitro[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303(1): H96-H105.

(收稿日期: 2021-04-29 修回日期: 2021-09-21)

(上接第 397 页)

- Mediterranean Region, 1990—2015: findings from the global burden of disease 2015 study[J]. Int J Public Health, 2018, 63(Suppl 1): S109-S121.
- [2] MANCANO M A. Gastrointestinal nodules and bleeding with long-term lanthanum use; dress and hepatotoxicity due to rivaroxaban; thrombocytopenia induced by pentoxifylline; amlodipine-induced Schamberg's disease; varenicline-induced acute liver injury[J]. Hosp Pharm, 2016, 51(4): 284-287.
- [3] IWATA T, KONDO Y, KIMURA O, et al. A case of previous infection with schistosomiasis japonica diagnosed holistically on the basis of various clinical examination findings[J]. Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2014, 111(5): 948-955.
- [4] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 175-177.
- [5] 马飞. 粪便自动化分析仪在粪便检查中的应用评价[D]. 北京: 解放军医学院, 2016: 1-52.
- [6] 王友强, 追麦, 兰由玉. FA160 全自动粪便分析仪的临床应用性能评价[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(4): 17-18.
- [7] 张晓梅, 黄维维, 沈斌, 等. 全自动粪便分析仪的临床应用评估[J/CD]. 临床检验杂志(电子版), 2020, 9(3): 343-344.
- [8] 丛玉隆. 尿液和粪便有形成分自动化分析专家共识[J]. 临床检验装备杂志, 2016, 2(3): 29.
- [9] 邓志勇, 陈小坚, 詹桂芬, 等. 定期培训和考核检验人员形态学辨识能力的探索[J]. 实验与检验医学, 2014, 31(3): 327-328.
- [10] 何书康, 王薇, 杜雨轩. 临床检验基于患者数据室内质量控制方法的研究与进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(11): 1390-1395.
- [11] 叶巍, 马杰. AVE-562 全自动粪便分析仪在粪便检测中的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(21): 3038-3040.
- [12] 王杰伟. 浅谈粪便标本的正确采集[J]. 现代保健·医学创新研究, 2008, 5(23): 175.

(收稿日期: 2021-03-28 修回日期: 2021-10-23)