

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2024.05.005

外周血单个核细胞 AIM2 炎症小体激活释放 白细胞介素-18 介导带状疱疹的临床研究 *

陈泽豪^{1,2#} 王 景^{2,3#} 高翔宇² 蒋昌宇² 李陈广^{2△} 肖礼祖^{1,2△}⁽¹⁾ 广东医科大学, 湛江 524023; ⁽²⁾ 华中科技大学协和深圳医院疼痛科, 深圳 518052; ⁽³⁾ 中山大学附属第七医院麻醉科, 深圳 518107)

摘 要 目的: 探索在带状疱疹病人不同时期的外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中 AIM2 炎症小体的活化和释放白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 情况并进行初步验证。**方法:** 收集并分离华中科技大学协和深圳医院疼痛科 2022 年 4 月至 2024 年 1 月 67 名急性期带状疱疹神经痛 (acute herpetic neuralgia, AHN)、58 名亚急性期带状疱疹神经痛 (subacute herpetic neuralgia, SHN)、38 名带状疱疹后神经痛 (post herpetic neuralgia, PHN) 病人及 30 名健康对照者的外周血单个核细胞和血清。通过实时荧光定量 PCR、蛋白质免疫印迹法及蛋白质芯片技术检测黑色素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2, AIM2) 炎症小体相关基因和蛋白的表达情况。**结果:** 在基因表达和蛋白质水平上与健康对照者相比, AIM2 和 IL-18 的基因表达在带状疱疹不同时期均显著上升 ($P < 0.05$), 且在 PHN 期差异尤为明显 ($P < 0.001$)。GSDMD 蛋白被切割活化, 产生具有细胞膜成孔活性的 GSDMD-NT 片段, 诱导细胞焦亡。不同带状疱疹时期病人血清中 IL-18 的分泌水平明显升高, 尤其在 PHN 时期, 上升最为显著。**结论:** 外周血单个核细胞中 AIM2 炎症小体激活, 释放的 IL-18 参与带状疱疹疾病的发生发展过程。

关键词 带状疱疹; AIM2 炎症小体; 白细胞介素-18; 细胞焦亡; 外周血单个核细胞

Clinical study on the activation and release of interleukin-18 by AIM2 inflammasome in peripheral blood mononuclear cells to mediate herpes zoster *

CHEN Ze-hao^{1,2#}, WANG Jing^{2,3#}, GAO Xiang-yu², JIANG Chang-yu², LI Chen-guang^{2△}, XIAO Li-zu^{1,2△}⁽¹⁾ Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; ⁽²⁾ Pain of Department, Huazhong University of Science and Technology Union Hospital, Shenzhen 518052, China; ⁽³⁾ Department of Anesthesiology, the Seventh Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China)

Abstract Objective: To explore the release of interleukin-18 (IL-18) from AIM2 inflammasome activation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of herpes zoster patients at different stages and to conduct preliminary validation. **Methods:** From April 2022 to January 2024, at Huazhong University of Science and Technology Union Shenzhen hospital, peripheral blood mononuclear cells and serum were collected and isolated from 67 patients with acute herpetic neuralgia (AHN), 58 patients with subacute herpetic neuralgia (SHN), 38 patients with post-herpetic neuralgia (PHN), and 30 healthy controls. The genes and proteins related to absence in melanoma 2 (AIM2) inflammasome were detected using Real-time quantitative PCR, western blotting, and protein chip technology. **Results:** Compared with healthy individuals, in gene expression and protein level, the expressions of AIM2 and IL-18 increased significantly in different stages of herpes zoster ($P < 0.05$), particularly in the PHN stage ($P < 0.001$). Cleavage of GSDMD produces GSDMD-NT fragments that have the ability to form pores in the cell membrane, ultimately leading to pyroptosis. The level of IL-18 secretion in the serum of patients with herpes zoster increases significantly in different stages, particularly during the PHN stage. **Conclusion:** The activation of the AIM2 inflammasome in peripheral blood mononuclear cells and the subsequent release of IL-18 are implicated in the onset and progression of herpes zoster disease.

* 基金项目: 深圳市科技研发资金基础研究面上项目 (JCYJ20230807115813028); 国家重点研发计划子课题 (2022YFC3602202)

共同第一作者

△ 通信作者 肖礼祖 nsyyjoe@live.cn; 李陈广 337916507@qq.com

Keywords herpes zoster; AIM2 inflammasome; interleukin-18 (IL-18); pyrocytosis; peripheral blood mononuclear cell

带状疱疹 (herpes zoster, HZ) 是由嗜神经水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 引起的累及沿周围神经带状分布表皮的一类急性感染性疾病^[1]。儿童时期初次感染 VZV 可表现为水痘 (varicella) 或隐匿性感染, VZV 可侵入并沿外周的感觉神经末梢逆向转运至脊髓背根神经节, 随后潜伏在背根神经节或颅神经的感觉神经节中。一旦机体免疫功能低下, 潜伏于神经元内的 VZV 病毒可被重新激活, 并再次沿感觉神经末梢传播至所支配的皮肤, 引发 HZ, 多表现为沿单侧胸段脊神经支配的皮节出现带状成簇水疱, 皮损 7~10 天后开始结痂, 2~4 周内皮疹愈合。同时, 受累神经纤维可发生不同程度的损伤, 致使感觉神经敏化及功能紊乱, 引发神经源性疼痛, 将这种疼痛称之为带状疱疹相关性神经痛 (herpes zoster related pain, ZRP)^[2]。主要表现为自发性的电击样、针刺样、烧灼样、撕裂样的神经病理性疼痛, 常伴有触诱发病、痛觉过敏和感觉麻木等不愉快感受, 严重影响病人的生活质量。根据病程长短, ZRP 被分为急性期 (acute herpetic neuralgia, AHN): 病程 < 1 个月, 亚急性期 (subacute herpetic neuralgia, SHN): 病程 1~3 个月, 带状疱疹后神经痛 (postherpetic neuralgia, PHN): 病程 > 3 个月 (国外), 病程 > 1 个月 (国内)^[2,3]。随着全球人口老龄化, HZ 的发病率还在逐年升高。PHN 作为 HZ 最常见的并发症, 其发生率与 HZ 病人发病年龄正相关, 60 岁以上的 HZ 病人 PHN 发生率可高达 65%~75%^[3]。PHN 的发生机制目前尚不清楚, 且尚无有效的治疗措施。因此, 亟需探索 PHN 可能的发生机制并寻求 PHN 的有效治疗措施。

固有免疫是机体抵御病原微生物入侵的第一道防线。而炎症小体 (inflammasomes) 活化是固有免疫的重要组成部分。炎症小体是一种能感应病原相关模式分子和细胞损伤相关分子信号的多蛋白复合体, 能针对不同的病原和损伤相关分子。细胞质 DNA 传感器黑色素瘤缺乏因子 2 (absent in melanoma 2, AIM2) 是 PYHIN 家族的成员, AIM2 作为一种胞质 DNA 感应器, 可识别细菌、病毒或者宿主细胞中异常的细胞质 dsDNA^[4]。激活 AIM2 炎症小体, 通过接头蛋白 ASC (apoptosis-associated speck-like protein contain a CARD), 随后募集 pro-caspase-1, 介导 pro-caspase-1 自我切割与活化, 活化的 caspase-1 切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 产生成熟的 IL-1 β 和 IL-18, 并分泌

到胞外。同时 caspase-1 也切割 GSDMD, 产生具有成孔活性的氨基末端 GSDMD-NT, 在膜上形成孔洞, 诱导细胞焦亡 (pyroptosis) 的发生; 从而调控炎症反应, 抵御病原微生物的感染与应激损伤^[4]。

目前多项研究证明, AIM2 炎症小体分泌的白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 与神经病理性疼痛的发生发展密切相关^[5]; IL-18 也被证明在 AHN 病人血液中有差异性上调^[6]。然而目前关于 AIM2 炎症小体是否会识别 VZV 病毒以及参与 HZ 的发病过程未见报道。我们推测, 水痘-带状疱疹病毒属于人类疱疹 α -亚科, 为 dsDNA 病毒^[7], 有可能通过激活 AIM2 炎症小体释放 IL-18, 进而影响 HZ 的病程发展, 甚至导致 PHN 的发生。因此, 本研究拟探索在不同时期 HZ 病人的外周血单个核细胞中 AIM2 炎症小体通路的活化情况, 探讨 AIM2 炎症小体与 HZ 发病的相关性, 同时为临床治疗 HZ 并预防 PHN 的发生提供理论依据以及新靶点。

方 法

1. 一般资料

本研究通过华中科技大学协和深圳医院伦理委员会审核 (伦理批号 LW-2024-003)。选取华中科技大学协和深圳医院疼痛科 2022 年 4 月至 2024 年 1 月符合纳入标准的受试者, 分为急性带状疱疹神经痛期 (AHN) 67 例、亚急性带状疱疹神经痛期 (SHN) 58 例和带状疱疹后神经痛期 (PHN) 38 例, 询问是否同意参加本研究, 同意的受试者均签署知情同意书。并以本单位招募的志愿者 30 名健康人的血液样本作为正常对照组。

纳入标准: ① HZ 的诊断标准根据《带状疱疹后神经痛诊疗中国专家共识》^[3], 由 2 名以上疼痛科执业医师进行诊断; ② 病人年龄 20~80 岁, 根据病程分为 AHN 组 (病程 < 1 个月)、SHN 组 (病程 1~3 个月) 和 PHN 组 (病程 > 3 个月); ③ 除 HZ 外, 无其他疼痛或慢性疼痛疾病; ④ 无其他免疫系统疾病、严重恶性肿瘤、病原菌感染及其他严重疾病。

排除标准: ① 有其他疼痛或慢性疼痛疾病; ② 有严重疾病或重要器官病变; ③ 恶性肿瘤或合并有自身免疫性疾病; ④ 近期服用免疫抑制剂病人; ⑤ 孕妇及哺乳期妇女。



2. 实验试剂和仪器

抗 AIM2 抗体 (#12948); 抗 NLRP3 抗体 (#15101); 抗 IL-1 β 抗体 (#12242); 抗 IL-18 抗体 (#67775); 抗 GAPDH 抗体 (#5174) 和 HRP-抗兔 IgG (#7074) 均为 Cell signaling technology 公司的产品。抗 Pro-caspase1 + p10 + p12 抗体 (#ab179515) 和抗 GSDMD 抗体 (#ab210070) 为 Abcam 公司的产品。人外周血单个核细胞分离液试剂盒 (#P8680) 为 Solarbio 公司的产品。MolPure[®] 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒 (#19221ES50); Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (#11141ES10) 和 Hieff UNICON[®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix (#11184ES08) 均为 Yeasen 公司的产品。人类炎症因子蛋白质芯片 QAH-INF-3 和 QAH-CYT-8 购买于 RayBiotech 公司。蔡司倒置荧光显微镜 (德国, Zeiss, Axio Observer D1); 高速低温台式离心机 (美国, Thermo scientific); CO₂ 培养箱 (美国, Thermo scientific); 激光扫描仪 (Innopsys, InnoScan 300 Microarray Scanner); 芯片洗板机 (美国, Thermo Scientific)。

3. 方法

(1) 外周血单个核细胞分离: 用肝素钠真空采血抗凝管抽取不同时期 HZ 病人外周静脉血 3 ml。将等量的分离液加入离心管中, 用吸管沿离心管壁将抗凝血缓慢加在分离液上, 注意避免冲散分层的液面。置于水平离心机, 3000 rpm, 离心 30 min。离心后会呈现明显的分层, 中间的白色絮状物为外周血单个核细胞层, 用吸管吸取细胞层。用 PBS 洗涤 2 次, 弃上清, 细胞重悬备用。

(2) 外周血单个核细胞 RNA 的抽提: 分离 HZ 病人的外周血单个核细胞, 使用 RNA 提取试剂盒抽提外周血单个核细胞中的总 RNA。加入裂解液, 反复吹打混匀。将处理好的匀浆液加到 DNA 吸附柱, 13,000 rpm, 离心 2 min, 收集含有 RNA 的滤液。加入等体积的结合液至 RNA 吸附通用柱中, 13,000 rpm, 离心 1 min, 弃掉滤液。加入去蛋白液,

13,000 rpm, 离心 1 min, 弃滤去滤液; 加入漂洗液洗涤 2 次, 在膜中央加入适量无 RNA 的水, 室温放置 2 min, 13,000 rpm, 离心 2 min, 收集滤液, 即为 RNA 溶液。样品可置于 -80℃ 长期保存。

(3) 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time, PCR): 将 PBMC 抽提的 RNA 按逆转录试剂盒操作说明书合成 cDNA。以 Primer-BLAST 设计引物 (见表 1), 上海生工生物工程有限公司合成全部引物。采用 Hieff UNICON[®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行 qPCR 扩增。以 GAPDH 作为内参基因, 采用相对定量法计算公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 计算目的基因的相对表达量。

(4) 蛋白质免疫印迹法: 收集细胞蛋白, 分离的人外周血单个核细胞, 加入适量预冷的细胞裂解液, 置于冰上充分裂解; 13,000 rpm, 离心 10 min。采用 BCA 法进行蛋白质浓度的测定, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜结束后, 室温封闭 1 h; 加入适量比例的一抗, 4℃, 摇床孵育过夜。加入二抗, 室温摇床孵育 1 h。摇床洗涤 3 次, 每次 5 min。将化学发光液 (BeyoECLPlus) 滴加到 PVDF 膜上, 充分反应 2 min。在暗房中使用 X 光片压片, 立即显影定影。采用 FluorChem8000 成像仪拍照记录结果, 最后用 AlphaEaseFC4.0 软件分析结果和进行灰度值的统计。

(5) 蛋白质芯片检测细胞因子: 收集 HZ 不同时期病人的非抗凝血, 室温静置 2 h, 3000 rpm, 离心 10 min; 收集血清。定量抗体芯片的封闭, 每个孔中加 100 μ l 的样品稀释液, 室温摇床上孵育 1 h。吸弃封闭液, 添加 75 μ l 的标准液和待测样品到孔中, 在摇床 4℃ 孵育过夜。使用 Thermo Scientific Wellwash Versa 芯片洗板机清洗玻片。添加 80 μ l 的检测抗体, 37℃ 摇床上孵育 1.5 h, 清洗玻片 2 次。添加 80 μ l 的 Cy3-链霉亲和素, 用铝箔纸包住玻片避光孵育, 37℃ 摇床上孵育 1 h, 清洗玻片 2 次。荧光检测, 采用激光扫描仪例如 InnoScan 300 扫描信号, 采用绿色通道 (激发频率 = 532 nm)。利用

表 1 目的基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of target genes

基因名称 Gene symbol	正向引物序列 (5' to 3') Forward primers (5' to 3')	反向引物序列 (3' to 5') Reverse primers (3' to 5')
AIM2	TGGCAAAACGTCTTCAGGAGG	AGCTTGACTTAGTGGCTTTGG
NLRP3	CCACAAGATCGTGAGAAAACCC	CGGTCTATGTGCTCGTCA
CASP1	TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA	GGCATCTGCGCTCTACCATC
IL-1 β	TTCGACACATGGGATAACGAGG	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
IL-18	TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	TCCGGGGTGCAATTATCTCTAC
ASC	TGGATGCTCTGTACGGGAAG	CCAGGCTGGTGTGAAACTGA
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCCATACTTCTCATGG

Genepix 软件获取信号并转换为数字, 进行数据分析, 通过标准曲线定量血清中细胞因子的浓度。

4. 统计学分析

所有实验均独立重复 3 次, 所得实验数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行单因素方差分析, 多组间数据比较则采用 Tukey post-hoc 检验和 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. HZ 病人不同时期外周血单个核细胞中炎症小体基因的表达情况

AIM2 和 NLRP3 是应答病毒感染的重要炎症小体信号通路^[8,9]。因此, 我们推测 AIM2 或/和 NLRP3 炎症小体可能参与了 HZ 的发生发展过程。通过收集 67 例 AHN 病人、58 例 SHN 病人、38

例 PHN 病人及 30 例健康人外周血, 进行外周血单个核细胞的分离以及 RNA 的提取。采用 qPCR 检测外周血单个核细胞中炎症小体基因的表达情况。结果显示, 与健康对照者相比, AIM2 基因表达在 HZ 不同时期均有显著的上升 ($P < 0.05$), 且在 PHN 期差异尤为明显 ($P < 0.001$, 见图 1A)。而 NLRP3 基因的表达水平, 在 HZ 不同时期差异均无统计学意义 (见图 1B)。AIM2 激活后募集接头蛋白 ASC, ASC 通过其 CARD 与 pro-caspase-1 的 CARD 结构同型互作, 组装成 AIM2 炎症小体。随后 pro-caspase-1 自我切割活化, 活化的 caspase-1 切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 产生成熟的 IL-1 β 和 IL-18^[10]。qPCR 检测结果发现, 组成性表达的 ASC 和 caspase-1 基因在 HZ 不同时期的表达量差异无统计学意义 (见图 1C, 1D)。IL-18 和 IL-1 β 的表达与 AIM2 的基因表达一致, 在 HZ 不同时期的表达量均有显著的上升 (见图 1E, 1F)。结果提示, AIM2 炎症小体相

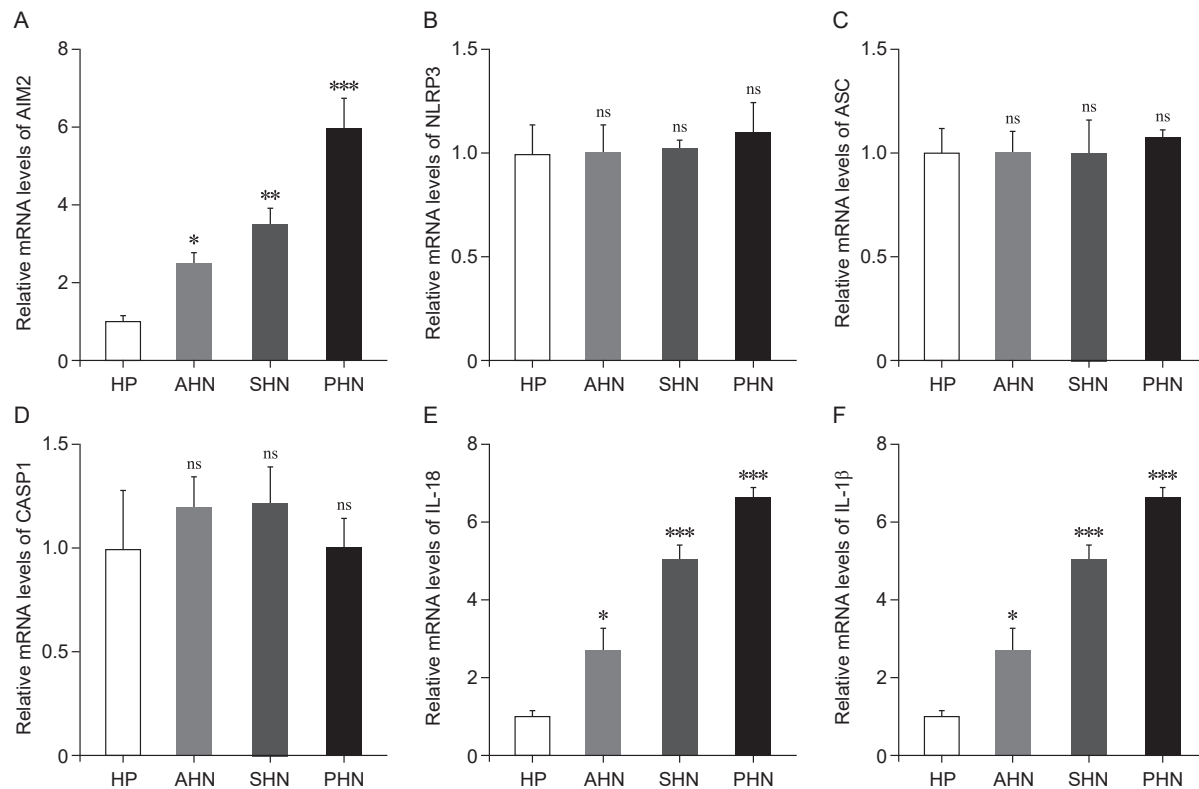


图 1 荧光定量 PCR 检测 HZ 病人不同时期外周血单个核细胞中炎症小体基因的表达情况 (A) AIM2; (B) NLRP3; (C) ASC; (D) CASP1; (E) IL-18; (F) IL-1 β 的基因表达水平通过 qPCR 检测。每组样本数量 HP 组 ($n = 30$), AHN 组 ($n = 67$), SHN 组 ($n = 58$), PHN 组 ($n = 38$); 单因素方差分析: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 HP 组相比; ns: 差异无统计学意义。

Fig. 1 The expression of inflammasome genes in peripheral blood mononuclear cells of herpes zoster patients at different stages was detected using qPCR.

(A) AIM2; (B) NLRP3; (C) ASC; (D) CASP1; (E) IL-18; (F) IL-1 β . The gene expression levels were detected by qPCR. The number of samples in each group was 30 in HP group, 67 in AHN group, 58 in SHN group and 38 in PHN group. One-way analysis of variance (ANOVA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compare with HP group; ns: not significant.



关基因在 HZ 不同时期的表达上升, 有可能参与 HZ 的发生发展; 而 NLRP3 炎症小体可能并不参与调控 HZ。

2. HZ 病人不同时期外周血单个核细胞中炎症小体的活化

基因表达水平的上升表明 AIM2 炎症小体可能参与 HZ 疾病的过程, 因此进一步检测蛋白表达水平和 AIM2 炎症小体的活化情况。分离外周血单个核细胞, 抽提细胞中的蛋白质, 通过蛋白质免疫印迹检测 HZ 不同时期病人中外周血单个核细胞中炎症小体蛋白的表达情况。结果发现 AIM2 蛋白表达在 HZ 不同时期均有显著上升, 而 NLRP3 蛋白的表达水平无差异; 这与基因水平的变化一致 (见图 2A-C)。ASC 是组成性表达, 且其表达量并不受 HZ 疾病的影响 (见图 2A, 2H)。Caspase-1 在不同的 HZ 时期中均有明显的切割, 产生活化的 p20 片段 (见图 2A, 2D, 2E)。在 HZ 不同时期能够明显诱导 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18 蛋白的表达, 且在 PHN 期差异最显著 (见图 2A, 2F, 2G)。上述结果进一步证明 AIM2 炎症小体不同的 HZ 时期中均有明显的活化, 可能参与 HZ 的发病过程。

3. HZ 不同时期病人 GSDMD 蛋白的活化及血清中 IL-18 的分泌情况

由于 AIM2 炎症小体在不同时期的 HZ 病人外周血单个核细胞中有明显的活化; 当 AIM2 炎症小体活化后, pro-caspase-1 自我切割活化, 产生有活性的 caspase-1 (p20), 进而切割 GSDMD, 诱导细胞焦亡。进一步通过蛋白质免疫印迹法检测不同时期的 HZ 病人外周血单个核细胞中 GSDMD 的切割情况, 结果显示在 PHN 时期, GSDMD 被显著切割产生具有细胞膜成孔活性的 GSDMD-NT 片段。在另一个 SHN 时期中, 也能检测出少量的 GSDMD-NT 片段, 而 AHN 时期并未检测到 GSDMD 的活性片段 (见图 3A)。另一方面, 活化的 caspase-1 切割 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18, 产生成熟的 IL-1 β 和 IL-18, 并分泌到胞外。因此, 进一步通过蛋白质芯片技术, 检测不同时期的 HZ 病人血清中 IL-1 β 和 IL-18 的分泌情况。结果显示, 与健康人比较, IL-1 β 的含量在不同的 HZ 时期的血清中并无差异, 且处于较低的分泌水平。而 IL-18 在不同的 HZ 时期的血清中有明显的升高水平, 尤其在 PHN 时期, 上升最为显著 (见图 3B-E)。综上所述, HZ 病人外周血单个核细胞中 AIM2 炎症小体活化后, 进一步诱导 GSDMD 蛋白的切割与活化, 从而介导 IL-18 的释放。

讨 论

精确辨别健康和受感染的宿主细胞, 是固有免疫系统的重要功能。炎症小体激活后, 启动程序性炎症性的细胞死亡——细胞焦亡; 从而调控炎症反应, 抵御病原微生物的感染与应激损伤^[11,12]。但是当细胞焦亡过度激活时, 与人类很多炎症性和自身免疫性疾病密切相关, 如动脉粥样硬化、痛风、脓毒症、cryopyrin 蛋白相关周期性综合征、糖尿病和阿尔茨海默病等。研究显示^[13], 神经系统疾病或损伤时, 细胞焦亡可发生在不同类型的神经细胞上, 促炎性细胞因子的释放导致神经细胞死亡, 轴突损伤等损伤后的继发性损伤, 加重了中枢神经系统的损伤, 介导中枢神经系统疾病的发生。目前, 神经性炎症、创伤、缺血性卒中、神经退行性病变及外周神经性疼痛等的发生发展均与 AIM2 炎症小体都有密切联系^[14], 是治疗相关神经病理性疼痛的重要靶点。

HZ 是一种由水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 所引起的急性感染性皮肤病。当机体免疫功能降低时, 病毒被激活并大量复制, 转移至皮肤, 穿透表皮, 引起 HZ。HZ 临床上分为三个时期段: 急性期、亚急性期和带状疱疹后神经痛期。VZV 是线性双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 分子结构, 长度约 125,000 碱基对; VZV 介导 HZ 病程发生发展的机制目前仍未完全阐明。在本研究中, 通过检测 HZ 病人外周血单个核细胞中 AIM2 炎症小体相关基因及蛋白的表达水平, 发现 AIM2 炎症小体在 HZ 病人各个时期均有明显的活化, 且在 PHN 期尤为显著, 随后 pro-caspase-1 自我切割活化, 活化的 caspase-1 切割 pro-IL-18, 产生成熟并释放 IL-18。同时切割 GSDMD, 产生具有膜成孔活性的 GSDMD-NT, 诱导细胞焦亡。这可能是 HZ 疾病, 尤其是 PHN 病人中后遗神经痛的发病机制之一, 具体的机制仍有待进一步阐明。与此同时, NLRP3 炎症小体虽然与 AIM2 炎症小体相似可以感知乙肝病毒、手足口病病毒及流感病毒等^[15]; 但是在 HZ 病人各个时期, 与健康人比较, NLRP3 的基因和蛋白表达水平均无差异, 表明 NLRP3 炎症小体可能并不参与 HZ 疾病的过程。

IL-18 是 IL-1 家族的成员, 具有促炎活性和多效性, 在各种疾病中发挥着重要的病理生理作用。IL-18 是一种与慢性疼痛密切相关的细胞因子^[16], 在 PHN 的发展中起关键作用。Liang 等^[17] 研究报道, 利用全基因组关联研究数据集, 进行双向双样本孟德尔随机化分析, 基于算法揭示了 IL-18 蛋白水

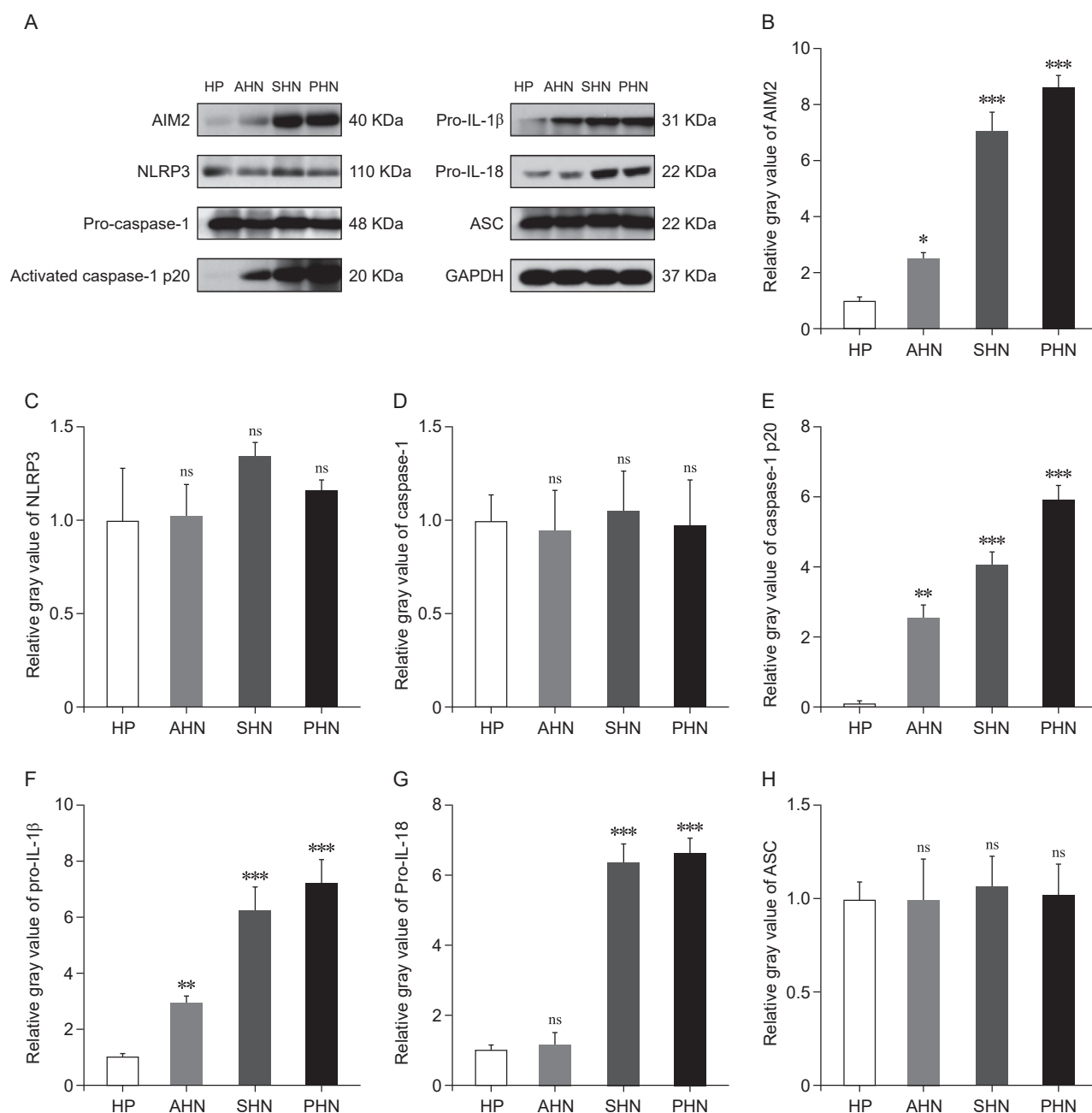


图 2 蛋白质免疫印迹法检测 HZ 病人不同时期外周血单个核细胞中炎症小体蛋白的表达情况
分离外周血单个核细胞，抽提细胞中的蛋白质，(A) 通过 Western blot 检测 AIM2、NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 和 ASC 蛋白的表达情况。GAPDH 作为细胞上样的对照；(B-H) 为 (A) 中的灰度值统计，通过 FluorChem8000 拍摄，AlphaEaseFC4.0 软件进行灰度分析检测。
每组样本数量 HP 组 ($n=30$)，AHN 组 ($n=67$)，SHN 组 ($n=58$)，PHN 组 ($n=38$)；单因素方差分析：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，与 HP 组相比；ns：差异无统计学意义

Fig. 2 The expression of inflammasome proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with herpes zoster at different times was detected using Western blot
The peripheral blood mononuclear cells were isolated and the protein in the cells was extracted. (A) Western blot was used to assess the expression levels of AIM2, NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 and ASC in the cell lysates. GAPDH was used as a loading control for cell lysates; (B-H) Histograms show the gray value of (A). The bands were taken by FluorChem8000 and gray values analysis was performed with AlphaEaseFC4.0 software.
The number of samples in each group was 30 in HP group, 67 in AHN group, 58 in SHN group, and 38 in PHN group. One-way analysis of variance (ANOVA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compare with HP group; ns: not significant.

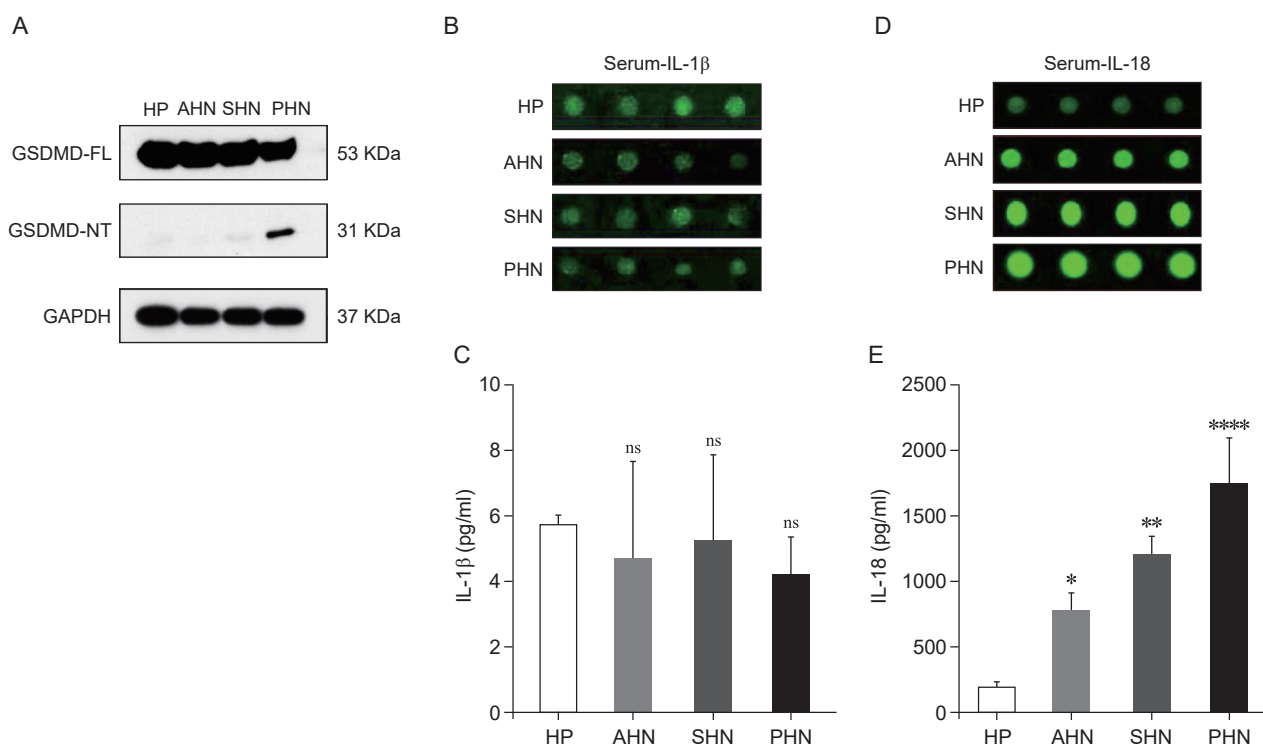


图 3 HZ 病人不同时期外周血单个核细胞中 GSDMD 蛋白的活化切割以及血清中 IL-18 的分泌情况
分离外周血单个核细胞，抽提细胞中的蛋白质，(A) 通过 Western blot 检测 GSDMD 的活化情况。GAPDH 作为细胞上的对照。收集 HZ 病人不同时期的血清，通过蛋白质芯片检测 IL-1β (B, C) 和 IL-18 (D, E) 的分泌情况。GSDMD-FL (gasderminD full-length), GSDMD-NT (gasderminD N-terminal fragment), 检测每组样本数量 HP 组 ($n = 30$), AHN 组 ($n = 67$), SHN 组 ($n = 58$), PHN 组 ($n = 38$); 单因素方差分析: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$; 与 HP 组相比; ns: 差异无统计学意义

Fig. 3 Activation cleavage of GSDMD protein and secretion of IL-18 in serum were observed in peripheral blood mononuclear cells at different stages in patients with herpes zoster
The peripheral blood mononuclear cells were isolated and the protein in the cells was extracted. (A) Western blot was used to assess the activation levels of GSDMD proteins in the cell lysate. GAPDH was used as a loading control for cell lysates. Serum from different periods of the herpes zoster patient was collected. The secretion of IL-1β (B, C) and IL-18 (D, E) was detected by protein chips. GSDMD-FL (gasderminD full-length), GSDMD-NT (gasderminD N-terminal fragment). The number of samples in each group was 30 in HP group, 67 in AHN group, 58 in SHN group, and 38 in PHN group. One-way analysis of variance (ANOVA). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$, compare with HP group; ns: not significant.

平升高对 PHN 风险之间有遗传关系和潜在因果关系。这些发现为确定 IL-18 蛋白水平在 PHN 发生风险中升高提供了新的见解，并可能有助于开发新的 PHN 预防和治疗方法，但其研究中并未发现 IL-18 蛋白水平升高的来源。而本研究证实了 HZ 不同时期外周血单个核细胞中 AIM2 炎症小体活化，继而介导 IL-18 的释放；尤其在 PHN 时期中 IL-18 的表达和分泌水平升高的最为显著，结果显示 AIM2 炎症小体的活化水平可能对 PHN 发生的风险及发展程度有密切联系。IL-18 受到 IL-18BP (IL-18 binding protein) 的负调节，IL-18BP 可以在功能上中和 IL-18 并阻止其与受体结合。因此，通过调节 IL-18BP 水平来减弱 IL-18 的促炎症反应有可能是缓解 HZ 及 PHN 的有效措施。而 IL-1β 作为细胞焦亡的又一重

要细胞因子，在本研究中发现，IL-1β 基因及蛋白水平的表达均增高，但在 HZ 病人外周血中的分泌水平与健康人无明显差异，且处于较低的水平（见图 3）。可能是由于 IL-1β 的前体半衰期短，极易降解，一旦受到炎症因子刺激，IL-1β 的基因转录被立即启动，切割产生的成熟 IL-1β，通过自分泌的方式，与邻近细胞上的受体迅速结合并发挥作用。多在局部发挥作用，可能也是导致 IL-1β 在血液中未被检测到的原因^[18]，其是否参与调控 HZ 疾病的过程，仍需进一步探索。

PHN 病人长期伴有的顽固性疼痛将导致其身体残疾、睡眠不良和心理社会功能障碍等。这不仅严重干扰其正常生活，同时也极大增加了家庭和社会经济负担^[19]。由于全球老龄化人口不断增长，在未

来十年中, HZ 和 PHN 的发病率将呈明显增长趋势, PHN 的有效防治将成为亟待解决的健康问题。本研究从临床样本出发, 从基因、蛋白及细胞因子水平, 首次揭示了 AIM2 炎症小体在 HZ 病程发展中的变化趋势, 尤其是其导致 PHN 的可能性, 为 PHN 的发病机制研究揭示了新的方向, 也为临床 PHN 的治疗提供了可能的新靶点。

本研究的不足之处: 目前对于 AIM2 炎症小体的探索仅局限于临床血液水平, 检测的对象仅局限于外周血单个核细胞, 其他的组织仍需进一步探索。虽然 IL-18 的分泌水平明显升高, 但关于 IL-18 与 IL-18BP 结合以及如何参与 HZ 及 PHN 的发病机制机理尚不清楚, 仍值得进一步研究。由于 VZV 具有高度的种属特异性, 其自然感染仅仅发生于人与大猩猩, 因此至今仍未建立一种合适的 HZ 病毒感染动物模型^[20]。待动物模型成熟后, 可使用 VZV 感染进一步在动物体内检测疼痛学行为及神经病理学变化, 以验证 IL-18 的致痛机制以及对 AIM2 炎症小体的激活进行干预, 进一步探索 AIM2 炎症小体活化与 HZ 疾病的发生发展的机制, 并为临床研发治疗 HZ 及 PHN 提供有效的药物研发靶点。

综上所述, 本研究通过分析不同时期 HZ 病人的血液样本, 分离外周血单个核细胞。在基因和蛋白表达水平上, HZ 不同时期病人外周血单个核细胞中 AIM2 的表达均有上升, 继而介导 GSDMD 的切割与活化, 且在 PHN 期差异最明显。细胞因子水平上, HZ 不同时期病人血清中 IL-18 分泌水平平均升高, PHN 期升高最显著。因此, 揭示了外周血单个核细胞中 AIM2 炎症小体激活, 释放 IL-18 参与 HZ 的发病过程, 有可能在一定程度上影响 PHN 的发生。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Kennedy PGE, Gershon AA. Clinical features of varicella-zoster virus infection[J]. *Viruses*, 2018, 10(11):609.
- [2] Zhang W, He C. Clinical efficacy of pulsed radiofrequency combined with intravenous lidocaine infusion in the treatment of subacute herpes zoster neuralgia[J]. *Pain Res Manag*, 2022, 2022:5299753.
- [3] 于生元, 万有, 万琪, 等. 带状疱疹后神经痛诊疗中国专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(3):161-167.
- [4] Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, *et al.* AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA[J]. *Nature*, 2009, 458(7237):509-513.
- [5] Bai X, Huang Y, Huang W, *et al.* Wnt3a/YTHDF1 regulated oxaliplatin-induced neuropathic pain via TNF- α /IL-18 expression in the spinal cord[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(4):1583-1594.
- [6] Khazan M, Nasiri S, Riahi S M, *et al.* Measurement of melatonin, indole-dioxygenase, IL-6, IL-18, ferritin, CRP, and total homocysteine levels during herpes zoster[J]. *J Med Virol*, 2020, 92(8):1253-1259.
- [7] Laing KJ, Ouwendijk WJD, Koelle DM, *et al.* Immunobiology of varicella-zoster virus infection[J]. *J Infect Dis*, 2018, 218(suppl_2):S68-S74.
- [8] Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes[J]. *Cell*, 2014, 157(5):1013-1022.
- [9] Choubey D. DNA-responsive inflammasomes and their regulators in autoimmunity[J]. *Clin Immunol*, 2012, 142(3):223-231.
- [10] Wang B, Tian Y, Yin Q. AIM2 inflammasome assembly and signaling[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1172:143-155.
- [11] Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(3):151-164.
- [12] 田胜, 吴伟. 细胞焦亡及其在神经病理性疼痛中作用的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30(4):290-295.
- [13] Platnich JM, Chung H, Lau A, *et al.* Shiga Toxin/Lipopolysaccharide activates caspase-4 and gasdermin d to trigger mitochondrial reactive oxygen species upstream of the NLRP3 inflammasome[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(6):1525-1536.e7.
- [14] Li B, Guo J, Zhou X, *et al.* The emerging role of pyroptosis in neuropathic pain[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 121:110562.
- [15] 王志会, 张建. 病毒感染对 NLRP3 炎症小体活化、组装和效应的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49(7):1208-1217.
- [16] Yamanishi K, Hata M, Gamachi N, *et al.* Molecular mechanisms of IL18 in disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24):17170.
- [17] Liang X, Fan Y. Bidirectional two-sample Mendelian randomization analysis reveals a causal effect of interleukin-18 levels on postherpetic neuralgia risk[J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1183378.
- [18] Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases[J]. *Blood*, 2011, 117(14):3720-3732.
- [19] Daniel HC, Narewska J, Serpell M, *et al.* Comparison of psychological and physical function in neuropathic pain and nociceptive pain: implications for cognitive behavioral pain management programs[J]. *Eur J Pain*, 2008, 12(6):731-741.
- [20] 吴松斌, 杨少敏, 黄佳彬, 等. 带状疱疹后神经痛动物模型及其机制研究新进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(2):84-91.