

NLRP1、NLRP3、Caspase-1 在子宫内膜异位症中的表达及对预后复发的影响

谢贝贝¹,程仁英²,汪永胜¹,杨高原¹,张 静¹,张元霞³

(临沂市人民医院 1.妇一科;2.产科;3.妇科,山东 临沂 276000)

[摘要]目的 探究 NLRP1、NLRP3、Caspase-1 在不同严重程度子宫内膜异位症(EMS)中的表达及其对预后的影响。方法 选择 2017 年 2 月至 2020 年 2 月在临沂市人民医院行腹腔镜手术治疗的 244 例 EMS 患者为研究组;按临床分期,将患者分为 I~II 期 162 例,III~IV 期 82 例;另选同期因良性卵巢囊肿行腹腔镜手术的 77 例患者为对照组,对比不同严重程度 EMS 患者异位内膜组织中 NLRP1、NLRP3 和 Caspase-1 的表达情况。将 244 例 EMS 患者分为复发组 37 例与未复发组 207 例,通过单因素分析,初步筛选 EMS 患者预后复发的影响因素,且采用多因素 Logistic 回归分析,进一步筛选独立危险因素。应用 Logistic 回归模型结合限制性立方样条模型(RCS),分析 EMS 患者异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与预后复发的剂量-反应关系。依据独立危险因素构建并验证列线图预测模型。结果 EMS 患者严重程度分期 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达的分布比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 9.827、4.916、4.258, $P < 0.05$);生殖道感染 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达的分布比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 6.746、13.166、11.643, $P < 0.05$)。研究组不同严重程度异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与对照组比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 18.546、22.582、19.361, $P < 0.05$)。NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量均在研究组 IV 期达到最高值,分别为 4.30 ± 0.62 、 5.59 ± 0.77 和 2.66 ± 0.68 。复发组与未复发组的 EMS 严重程度分期、生殖道感染、术前痛经史的分布比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 22.544、18.153、8.882, $P < 0.05$);复发组与未复发组的 C 反应蛋白(CRP)、白细胞计数(WBC),以及异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达量比较,差异均有统计学意义(t 值分别为 3.727、5.486、13.935、28.167、23.003, $P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示,EMS 严重程度分期($OR = 1.476$, 95% $CI: 1.149 \sim 1.826$)、生殖道感染($OR = 1.256$, 95% $CI: 1.028 \sim 1.403$),以及 NLRP1 mRNA($OR = 3.076$, 95% $CI: 1.363 \sim 4.371$)、NLRP3 mRNA($OR = 1.965$, 95% $CI: 1.685 \sim 2.354$)、Caspase-1 mRNA($OR = 2.245$, 95% $CI: 1.232 \sim 3.152$)表达量均是 EMS 患者预后复发的独立危险因素($P < 0.05$)。RCS 模型分析显示,在 NLRP1 mRNA 表达量为 2.525($OR = 3.076$, 95% $CI: 1.363 \sim 4.371$)、NLRP3 mRNA 表达量为 3.402($OR = 1.965$, 95% $CI: 1.685 \sim 2.354$)、Caspase-1 mRNA 表达量为 1.877($OR = 2.245$, 95% $CI: 1.232 \sim 3.152$)处,发生预后复发的风险最大。利用危险因素建立列线图模型,模型具有良好的区分度、准确性。结论 随着 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量的升高,子宫内膜异位症预后复发的危险性随之升高。严重程度分级、生殖道感染,以及 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA 表达量均是子宫内膜异位症患者预后复发的独立危险因素。

[关键词] NOD 样受体蛋白 1; NOD 样受体蛋白 3; 半胱氨酸蛋白酶 1; 子宫内膜异位症; 预后

Doi:10.3969/j.issn.1673-5293.2024.11.007

[中图分类号] R173

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-5293(2024)11-0050-11

Expression of NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 in endometriosis and their impact on prognosis and recurrence

XIE Beibei¹, CHENG Renying², WANG Yongsheng¹, YANG Gaoyuan¹, ZHANG Jing¹, ZHANG Yuanxia³

(1. First Department of Gynecology, Linyi People's Hospital, Shandong Linyi 276000, China;

2. Department of Obstetrics, Linyi People's Hospital, Shandong Linyi 276000, China; 3. Department of

Gynecology, Linyi People's Hospital, Shandong Linyi 276000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 in endometriosis (EMS) of different severity and their influence on prognosis. **Methods** A total of 244 patients with endometriosis who underwent laparoscopic surgery in our hospital from January 2017 to January 2020 were selected as the study group, including 162 patients in stage I to II group, 82

[收稿日期] 2023-05-30

[作者简介] 谢贝贝(1979—),女,副主任医师,硕士,主要从事妇科肿瘤的研究。

[通讯作者] 张元霞,副主任医师。

patients in stage III to IV group; the control group consisted of 77 patients with benign ovarian cysts undergoing laparoscopic surgery during the same period. The expressions of NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 in three groups were compared. 244 patients with EMS were divided into two groups: recurrence group ($n=37$) and non-recurrence group ($n=207$). The factors influencing prognosis of EMS patients were preliminarily screened through univariate analysis, and then multivariate Logistic regression analysis was used to further screen independent risk factors. Logistic regression model combined with restricted cubic spline model (RCS) was used to analyze the dose-response relationship between the expressions of NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 and prognosis of EMS patients. The nomogram prediction model was constructed and verified according to independent factors. **Results** There were significant differences in the expression distribution of NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 in EMS patients with different severity stages (χ^2 values were 9.827, 4.916 and 4.258, respectively, $P<0.05$). There were significant differences in the distribution of NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 expression in EMS patients with and without reproductive tract infection (χ^2 values were 6.746, 13.166 and 11.643, respectively, $P<0.05$). The expressions of NLRP1 mRNA, NLRP3 mRNA and Caspase-1 mRNA in endometrial tissues of different severity of ectopic in the study group were statistically significant compared with those in the control group (F values were 18.546, 22.582 and 19.361, respectively, $P<0.05$). The expression levels of NLRP1 mRNA, NLRP3 mRNA, and Caspase-1 mRNA reached their highest values in stage IV of the study group, with values of 4.30 ± 0.62 , 5.59 ± 0.77 , and 2.66 ± 0.68 , respectively. The distribution of EMS severity staging, reproductive tract infection, and preoperative history of dysmenorrhea was significantly different between the recurrence group and the non-recurrence group (χ^2 values were 22.544, 18.153 and 8.882, respectively, $P<0.05$); the levels of CRP, WBC, and the expression of NLRP1 mRNA, NLRP3 mRNA, and Caspase-1 mRNA in ectopic endometrial tissues were significantly different between the recurrence group and the non-recurrence group (t values were 3.727, 5.486, 13.935, 28.167 and 23.003, respectively, $P<0.05$). Multivariate logistic regression analysis revealed that EMS severity staging ($OR=1.476$, 95% $CI: 1.149-1.826$), reproductive tract infection ($OR=1.256$, 95% $CI: 1.028-1.403$), and the expression levels of NLRP1 mRNA ($OR=3.076$, 95% $CI: 1.363-4.371$), NLRP3 mRNA ($OR=1.965$, 95% $CI: 1.685-2.354$), and Caspase-1 mRNA ($OR=2.245$, 95% $CI: 1.232-3.152$) were all independent risk factors for recurrence in EMS patients ($P<0.05$). RCS model analysis indicated that the highest risk of recurrence occurred at NLRP1 mRNA expression level of 2.525 ($OR=3.076$, 95% $CI: 1.363-4.371$), NLRP3 mRNA expression level of 3.402 ($OR=1.965$, 95% $CI: 1.685-2.354$), and Caspase-1 mRNA expression level of 1.877 ($OR=2.245$, 95% $CI: 1.232-3.152$). The nomogram model was established by using the risk factors. The model has good discrimination and accuracy. **Conclusion** With the increase of NLRP1 mRNA, NLRP3 mRNA and Caspase-1 mRNA expression levels, the risk of prognosis recurrence of endometriosis increased. The severity grade, reproductive tract infection, NLRP1, NLRP3 and Caspase-1 expression levels are all independent risk factors for the prognosis and recurrence in EMS patients.

[Key words] NLRP1; NLRP3; Caspase-1; endometriosis; prognosis

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)常发于育龄期女性,是临床中常见的妇科疾病,常伴随痛经、性交痛甚至导致不孕,严重影响患者的身心健康。腹腔镜手术为治疗 EMS 的主要方式,该方法有较好的治疗效果,还可保留患者的生育功能,但也有患者出现复发甚至病情加重的情况^[1],导致无法达到理想的治疗效果。因此,探究 EMS 复发的危险因素至关重要。

炎症反应可导致 EMS 异位病灶产生侵袭、增殖和分化^[2]。炎症小体核苷酸结合寡聚化域样受体蛋白 1(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 1, NLRP1)由感受器、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和效应蛋白半胱氨酸蛋白酶

1(Caspase-1)所构成的大分子多蛋白复合体组成, NLRP1 特有的 CARD 结构域能通过 CARD-CARD 相互作用直接结合 Caspase-1,完成炎症小体 NLRP1 的装配^[3]。相关研究显示,人体的炎性小体 NOD 样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)也是炎症反应的重要组成部分, NLRP1 和 NLRP3 作为炎症反应上游,激活 Caspase-1,进而引起白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的成熟和分泌,并诱导细胞焦亡,引起炎症反应的放大^[4]。目前 NLRP1、NLRP3 和 Caspase-1 在不同严重程度异位内膜组织中的表达鲜有报道。因此,本研究将探讨炎症小体 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 在不同严重程度 EMS 中的表达及对预后的影响,以期为 EMS 的临床治疗提供相应的参考。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

回顾性分析 2017 年 2 月至 2020 年 2 月期间于临沂市人民医院行腹腔镜手术治疗的 EMS 患者 244 例为研究组;患者年龄为 22~39 岁,平均年龄(31.30 ± 2.47)岁。根据美国生育协会(American Fertility Society, AFS)制定的 EMS 分期标准,对患者病变累及的部位、大小及粘连程度等进行评分,其中 1~5 分为 I 期、6~15 分为 II 期、16~40 分为 III 期、>40 分为 IV 期;I~II 期患者 162 例,III~IV 期患者 82 例。按照 3:1 的比例,选取同期因良性卵巢囊肿行腹腔镜手术的患者 81 例为对照组,其中失访或中途退出的患者 4 例,对照组实际纳入 77 例。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准:①明确诊断为 EMS;②未接受过放、化疗;③首次行腹腔镜手术;④年龄 ≥ 18 岁。排除标准:①合并免疫性疾病;②恶性肿瘤患者;③入组前的 3 个月内未服用过任何抗炎、激素或免疫调节类药物;④月经不规律。

本研究已经通过临沂市人民医院医学伦理委员会审批(2017020035)。

1.3 研究方法

1.3.1 临床资料的收集

收集患者的年龄、体质指数(body mass index, BMI)、孕次、产次、吸烟史、饮酒史、流产史、阴道出血(除正常月经以外的生殖系统出血)、生殖道感染(包括细菌性阴道炎、滴虫性阴道炎、霉菌性阴道炎)及术前痛经史等一般临床资料。

采集患者治疗前清晨空腹(禁食 8~12h)外周血 5mL,离心($3\ 000\text{rpm}$, 15min)分离血清,检测并记录空腹血糖(fasting blood glucose, FPG)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血小板计数(platelet count, PLT)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)及抗苗勒氏管激素(anti-mullerian hormone, AMH)水平。

1.3.2 手术方法

患者月经干净 3~7 天后进行手术。常规消毒铺巾,气管插管全身麻醉。患者取仰卧位,取脐轮缘

横切口,建立 CO_2 气腹,在腹腔镜下将手术操作管套置入体内,探查盆腹腔,钝性分离粘连,合并卵巢子宫内异位囊肿行剥除术及卵巢缝合成形,合并深部子宫内膜病灶(deep infiltrating endometriosis, DIE)行切除术;同时行输卵管通液术,检查输卵管的通畅度,电凝止血后,使用生理盐水冲洗盆腔至冲洗液清亮后,常规缝合。术后根据患者具体情况,采用醋酸曲普瑞林(国药准字:H20054351)治疗,皮下注射 3.75mg,每月 1 次,连用 6 个月。

1.3.3 免疫组化及评估方法

腹腔镜术后,用 10%甲醛溶液固定异位内膜组织,常规石蜡包埋后,4 μm 连续切片,常规脱蜡至水,用 3%过氧化物酶阻断剂去除内源性过氧化物酶,微波下修复抗原;洗涤、封闭后,加入均以 1:200 稀释的 NLRP1、NLRP3 和 Caspase-1 抗体,于 4℃ 过夜。次日,洗涤后加入生物素标记的二抗(1:1 000),室温下反应 1h,二氨基联苯胺显色、脱水、封片。

根据阳性细胞百分率和染色强度对 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达进行判定,阳性细胞分级包括:0 级(0%, 0 分)、1 级($\leq 10\%$, 1 分)、2 级(11%~50%, 2 分)、3 级(51%~80%, 3 分)和 4 级($>80\%$, 4 分),染色强度评分包括:阴性(0 分)、弱阳性(1 分)、中等阳性(2 分)和强阳性(3 分)。以阳性细胞分级和染色强度评分乘积作为 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达的最终评分,0~6 分为低表达,7~12 分为高表达。

1.3.4 异位内膜组织中 NLRP1 mRNA 和 NLRP3 mRNA 及 Caspase-1mRNA 表达量

采用 Trizol 法提取异位内膜组织总 RNA,取 2 μg RNA 采用逆转录试剂盒合成 cDNA;以 cDNA 为模板进行实时荧光定量聚合酶链式反应。扩增反应的扩增参数为:95℃、5min,然后 95℃、10s, 60℃、20s, 72℃、15s, 40 个循环,所得 PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因 NLRP1 mRNA 和 NLRP3 mRNA 及 Caspase-1mRNA 表达量。

1.3.5 随访及预后的评估

对 244 例 EMS 患者术后随访 3 年,随访截止时间为 2023 年 3 月,多数患者的临床症状有所缓解;其中 37 例患者接受治疗 6 个月后病情复发甚至加重,将其纳入复发组;另外 207 例未复发者纳入未复发组。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以例数(百分率)[$n(\%)$]表示,单因素分析采用 χ^2 检验、 t 检验和 F 检验,将单因素分析中差异有统计学意义的因素(连续变量以中位数为取界值进行二分类)纳入多因素 Logistic 回归分析,以差异有统计学意义的变量为独立危险因素。采用独立危险因素构建 EMS 患者预后复发风险的列线图模型。采用限制性立方样条模型(restricted cubic spline,RCS)分析 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与 EMS 预后复发的关系。绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic,ROC)曲线,对 EMS 患者预后复发风险列线图模型的区分度进行检验。采用 Bootstrap 法对列线图模型进行重复抽样 1 000 次进行内部验证,采用一致性指数(consistency index,

C-index)评价模型的区分度,C-index ≥ 0.700 表示模型区分度较好。以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EMS 患者临床病理特征的免疫组化指标表达分布的对比

以各项免疫组化指标阳性细胞分级和染色强度评分,将其分为低表达与高表达。EMS 患者严重程度分期 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达的分布比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 9.827、4.916、4.258, $P < 0.05$);生殖道感染 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达的分布比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 6.746、13.166、11.643, $P < 0.05$);而流产史、阴道出血、术前痛经史、吸烟史、饮酒史的 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 表达的分布比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 EMS 患者临床病理特征的免疫组化指标表达分布的比较 [$n(\%)$]
Table 1 Comparison of the expression distribution of immunohistochemical markers
in clinical pathological features of EMS patients [$n(\%)$]

项目	NLRP1		NLRP3		Caspase-1	
	低表达(n=166)	高表达(n=78)	低表达(n=143)	高表达(n=101)	低表达(n=150)	高表达(n=94)
EMS 严重程度分期						
I ~ II 期	121(72.89)	41(52.56)	103(72.03)	59(58.42)	107(71.33)	55(58.51)
III ~ IV 期	45(27.11)	37(47.44)	40(27.97)	42(41.58)	43(28.67)	39(41.49)
χ^2	9.827		4.916		4.258	
P	0.002		0.027		0.039	
流产史						
有	45(27.11)	18(23.08)	33(23.08)	30(29.70)	40(26.67)	23(24.47)
无	121(72.89)	60(76.92)	110(76.92)	71(70.30)	110(73.33)	71(75.53)
χ^2	0.450		1.357		0.146	
P	0.502		0.244		0.703	
阴道出血						
有	45(27.11)	15(19.23)	32(22.38)	28(27.72)	40(26.67)	20(21.28)
无	121(72.89)	63(80.77)	111(77.62)	73(72.28)	110(73.33)	74(78.72)
χ^2	1.776		0.912		0.905	
P	0.183		0.340		0.341	
生殖道感染						
有	41(24.70)	32(41.03)	30(20.98)	43(42.57)	33(22.00)	40(42.55)
无	125(75.30)	46(58.97)	113(79.02)	58(57.43)	117(78.00)	54(57.45)
χ^2	6.746		13.166		11.643	
P	0.009		<0.001		0.001	

(转下表)

(续上表)

项目	NLRP1		NLRP3		Caspase-1	
	低表达(n=166)	高表达(n=78)	低表达(n=143)	高表达(n=101)	低表达(n=150)	高表达(n=94)
术前痛经史						
有	88(53.01)	35(44.87)	76(53.15)	47(46.53)	78(52.00)	45(47.87)
无	78(46.99)	43(55.13)	67(46.85)	54(53.47)	72(48.00)	49(52.13)
χ^2	1.407		1.035		0.394	
P	0.236		0.309		0.530	
吸烟史						
有	15(9.04)	6(7.69)	10(6.99)	11(10.89)	11(7.33)	10(10.64)
无	151(90.96)	72(92.31)	133(93.01)	90(89.11)	139(92.67)	84(89.36)
χ^2	0.122		1.143		0.802	
P	0.727		0.285		0.370	
饮酒史						
有	46(27.71)	21(26.92)	43(30.07)	24(23.76)	40(26.67)	27(28.72)
无	120(72.29)	57(73.08)	100(69.93)	77(76.24)	110(73.33)	67(71.28)
χ^2	0.017		1.182		0.123	
P	0.898		0.277		0.726	

2.2 研究组不同严重程度异位内膜组织中 NLRP1 mRNA 和 NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与对照组的对比

2.2.1 研究组与对照组的比较

研究组不同严重程度异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与对照组比较,差异均有统计学意义(F 值分别为 18.546、22.582、19.361, $P < 0.05$); NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量均在研究组Ⅳ期达到最高值,分别为 4.30 ± 0.62 、 5.59 ± 0.77 和 2.66 ± 0.68 ,见表 2。

2.2.2 研究组各期的比较

研究组内两两比较,结果显示,研究组各分期患者异位内膜组织中 NLRP1 mRNA ($t = 2.258 \sim 22.473$, $P < 0.05$)、NLRP3 mRNA ($t = 3.782 \sim 19.233$, $P < 0.05$)及 Caspase-1 mRNA ($t = 3.089 \sim 16.410$, $P < 0.05$)表达量比较,差异均有统计学意义,见表 2。

2.2.3 研究组各期与对照组的比较

研究组Ⅰ和Ⅱ期异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与对照

组比较,差异均无统计学意义(研究组Ⅰ期与对照组: t 值分别为 1.393、1.398、1.652, $P > 0.05$;研究组Ⅱ期与对照组: t 值分别为 1.289、1.671、1.384, $P > 0.05$);研究组Ⅲ期和Ⅳ期异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量均明显高于对照组,经比较差异均有统计学意义(研究组Ⅲ期与对照组: t 值分别为 25.710、25.836、12.604, $P < 0.05$;研究组Ⅳ期与对照组: t 值分别为 29.796、34.344、18.068, $P < 0.05$),见表 2。

2.3 EMS 患者预后复发的单因素分析

复发组与未复发组的 EMS 严重程度分期、生殖道感染、术前痛经史的分布比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 22.544、18.153、8.882, $P < 0.05$);复发组与未复发组的 CRP、WBC,以及异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达量比较,差异均有统计学意义(t 值分别为 3.727、5.486、13.935、28.167、23.003, $P < 0.05$);复发组与未复发组的年龄、BMI、孕次、产次、FSH、LH、AMH、FPG、PLT,以及流产史、吸烟史、饮酒史、阴道出血的分布比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

表 2 研究组不同严重程度异位内膜组织中 NLRP1 和 NLRP3 及 Caspase-1 表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the expression levels of NLRP1, NLRP3, and Caspase-1 in ectopic endometrial tissue of different severity in groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	NLRP1 mRNA 表达量	NLRP3 mRNA 表达量	Caspase-1 mRNA 表达量	组别	NLRP1 mRNA 表达量	NLRP3 mRNA 表达量	Caspase-1 mRNA 表达量
研究组				t_2	22.473	19.233	12.200
I 期	2.03±0.46	2.68±0.59	1.33±0.17	P_2	<0.001	<0.001	<0.001
II 期	2.37±0.59	3.19±0.64	1.51±0.19	t_3	16.510	17.387	16.410
III 期	3.92±0.60	4.77±0.78	2.13±0.60	P_3	<0.001	<0.001	<0.001
IV 期	4.30±0.62	5.59±0.77	2.66±0.68	t_4	15.133	12.891	8.167
对照组	1.88±0.35	2.18±0.41	1.27±0.12	P_4	<0.001	<0.001	<0.001
F	18.546	22.582	19.361	t_5	11.074	12.999	12.321
P	<0.001	<0.001	<0.001	P_5	<0.001	<0.001	<0.001
t_1	4.121	5.247	6.337	t_6	2.258	3.782	3.089
P_1	<0.001	<0.001	<0.001	P_6	0.027	<0.001	0.003

注: F 、 P 研究组各期与对照组的比较; t_1 、 P_1 研究组 I 期与 II 期的比较; t_2 、 P_2 研究组 I 期与 III 期的比较; t_3 、 P_3 研究组 I 期与 IV 期的比较; t_4 、 P_4 研究组 II 期与 III 期的比较; t_5 、 P_5 研究组 II 期与 IV 期的比较; t_6 、 P_6 研究组 III 期与 IV 期的比较。

表 3 EMS 患者预后复发的单因素分析 [$\bar{x} \pm s$, n(%)]

Table 3 Univariate analysis of prognosis and recurrence in EMS patients [$\bar{x} \pm s$, n(%)]

项目	未复发组(n=207)	复发组(n=37)	t/χ^2	P
年龄(岁)	32.24±3.48	33.16±2.92	1.515	0.131
BMI(kg/m ²)	24.31±2.34	24.26±2.28	0.120	0.904
孕次(次)	1.44±0.76	1.68±1.02	1.672	0.096
产次(次)	1.28±0.68	1.49±0.97	1.611	0.109
EMS 严重程度分期			22.544	<0.001
I ~ II 期	150(72.46)	12(32.43)		
III ~ IV 期	57(27.54)	25(67.57)		
流产史			0.051	0.821
有	54(26.09)	9(24.32)		
无	153(73.91)	28(75.68)		
吸烟史			0.014	0.907
有	18(8.70)	3(8.11)		
无	189(91.30)	34(91.89)		
饮酒史			0.004	0.949
有	57(27.54)	10(27.03)		
无	150(72.46)	27(72.97)		
阴道出血			0.002	0.967
有	51(24.64)	9(24.32)		
无	156(75.36)	28(75.68)		
生殖道感染			18.153	<0.001
有	51(24.64)	22(59.46)		
无	156(75.36)	15(40.54)		

(转下表)

(续上表)

项目	未复发组(n=207)	复发组(n=37)	t/χ^2	P
术前痛经史			8.882	0.003
有	96(46.38)	27(72.97)		
无	111(53.62)	10(27.03)		
FSH(IU/L)	4.21±0.76	4.27±0.85	0.434	0.664
LH(IU/L)	4.18±0.86	4.15±0.95	0.192	0.848
AMH(ng/mL)	4.22±1.47	4.28±1.36	0.231	0.817
FPG(mmol/L)	4.47±1.63	4.41±2.08	0.197	0.844
CRP(mg/L)	6.07±1.12	6.88±1.67	3.727	<0.001
WBC($\times 10^9/L$)	8.34±1.72	10.17±2.56	5.486	<0.001
PLT($\times 10^9/L$)	195.16±21.82	194.12±23.37	0.264	0.792
NLRP1 mRNA 表达量	2.11±0.39	3.13±0.51	13.935	<0.001
NLRP3 mRNA 表达量	2.36±0.39	4.46±0.55	28.167	<0.001
Caspase-1 mRNA 表达量	1.30±0.27	2.52±0.42	23.003	<0.001

2.4 影响 EMS 患者预后复发的多因素 Logistic 回归分析

将筛选出的因素作为自变量并进行赋值,见表4;其中连续变量以中位数为取界值进行二分类,以EMS预后是否复发(是=1,否=0)为因变量进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示,EMS 严重程度分期、生殖道感染、NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达量均是 EMS 患者预后复发的独立危险因素($P<0.05$),见表5。

2.5 EMS 患者预后复发与 NLRP1 mRNA 和 NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量的关系

采用4个节点的RCS模型分析NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达量连续变化与 EMS 患者预后复发的关系;在NLRP1 mRNA 表达量为2.525($OR=3.076, 95\%CI:1.363\sim 4.371$)、

NLRP3 mRNA 表达量为3.402($OR=1.965, 95\%CI:1.685\sim 2.354$)、Caspase-1 mRNA 表达量为1.877($OR=2.245, 95\%CI:1.232\sim 3.152$)处,发生预后复发的风险最大,见图1。

表4 各影响因素的赋值表

Table 4 Assignment table of various influencing factors

因素	赋值
EMS 严重程度分期	I ~ II = 0; III ~ IV = 1
生殖道感染	否 = 0; 是 = 1
术前痛经史	否 = 0; 是 = 1
CRP(mg/L)	<6.50 = 0; ≥ 6.50 = 1
WBC($\times 10^9/L$)	<9.00 = 0; ≥ 9.00 = 1
NLRP1 mRNA 表达量	<2.52 = 0; ≥ 2.52 = 1
NLRP3 mRNA 表达量	<3.40 = 0; ≥ 3.40 = 1
Caspase-1 mRNA 表达量	<1.87 = 0; ≥ 1.87 = 1

表5 EMS 患者预后复发的多因素 Logistic 回归分析

Table 5 Multivariate logistic regression analysis of prognosis and recurrence in EMS patients

因素	β	S.E.	Wald χ^2	OR	95%CI	P
EMS 严重程度分期	0.389	0.813	0.229	1.476	1.149~1.826	0.014
生殖道感染	0.228	0.160	2.031	1.256	1.028~1.403	0.025
术前痛经史	0.503	0.799	0.396	1.653	0.863~2.085	0.094
CRP(mg/L)	0.942	0.549	2.944	2.565	0.758~3.316	0.121
WBC($\times 10^9/L$)	1.452	0.675	4.627	4.271	0.659~5.634	0.057
NLRP1 mRNA 表达量	1.124	0.772	2.120	3.076	1.363~4.371	0.017
NLRP3 mRNA 表达量	0.675	0.532	1.610	1.965	1.685~2.354	0.009
Caspase-1 mRNA 表达量	0.809	0.357	5.135	2.245	1.232~3.152	0.035

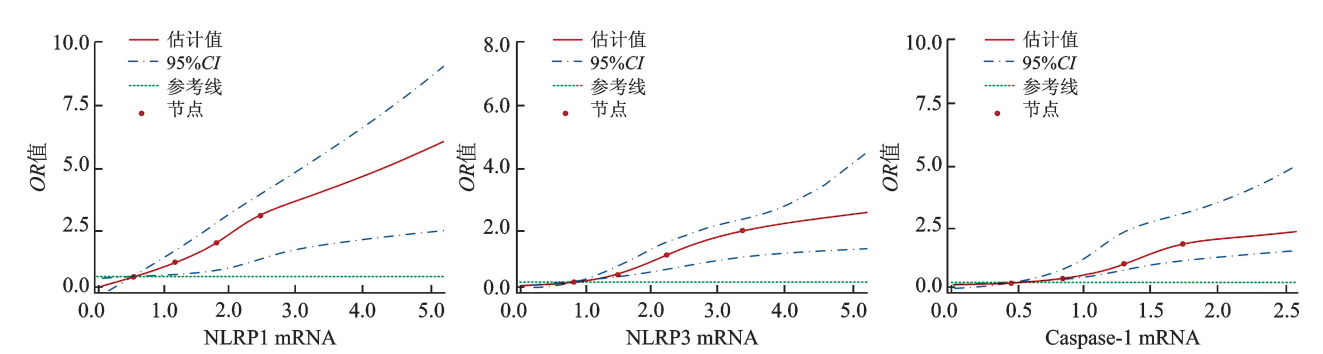


图 1 EMS 患者预后复发与 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达量的关系

Fig.1 The relationship between prognosis and recurrence in EMS patients and the expression levels of NLRP1 mRNA,NLRP3 mRNA,and Caspase-1 mRNA

2.6 EMS 患者预后复发风险列线图模型

将多因素 Logistic 回归分析中引起 EMS 患者预后复发的 5 个独立危险因素作为预测因子构建列线图模型,预测 EMS 患者预后复发风险率,结果显示,EMS 严重程度分期为Ⅲ~Ⅳ期赋分 57.07 分,有生殖道感染赋分 53.17 分,NLRP1 mRNA 表达量为 4.26 赋分 29.29 分,NLRP3 mRNA 表达量为 3.39 赋分 27.50 分,Caspase-1 mRNA 表达量为 2.22 赋分 33.17 分,所得总分为 200.20 分,对应的列线图模型预测 EMS 患者预后复发风险率为 71.13%,见图 2。

2.7 模型的验证

绘制 ROC 曲线,对 EMS 患者预后复发风险列线图模型的区分度进行检验,结果显示,模型的实际 C-index 值为 0.826,区分度良好,见图 3。采用 Bootstrap 重复抽样方法对模型进行内部验证,结果

显示,EMS 患者预后复发风险列线图模型与实际发生风险的平均误差为 0.012,准确度良好,校准曲线见图 4。

2.8 不同 NLRP1 和 NLRP3 及 Caspase-1 表达情况对 EMS 患者术后复发的影响分析

采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,分析 NLRP1、NLRP3 和 Caspase-1 表达对患者术后复发的影响情况,结果显示,免疫组化 3 项指标表达均会明显影响 EMS 的复发,NLRP1、NLRP3 和 Caspase-1 高表达的患者复发风险更高,差异均有统计学意义(高 NLRP1 与低 NLRP1 患者 EMS 比较, $\chi^2=6.254,P<0.05$;高 NLRP3 与低 NLRP3 患者比较, $\chi^2=7.024,P<0.05$;高 Caspase-1 与低 Caspase-1 患者 EMS 比较, $\chi^2=5.717,P<0.05$),见图 5。

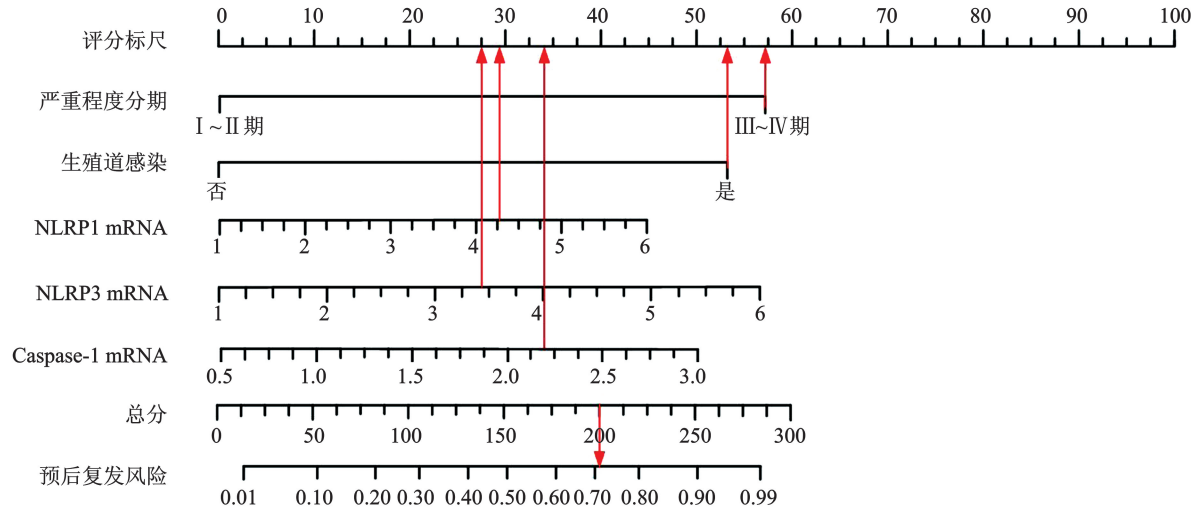


图 2 EMS 患者预后复发风险的列线图模型

Fig.2 Nomogram model for the risk of prognosis and recurrence in EMS patients

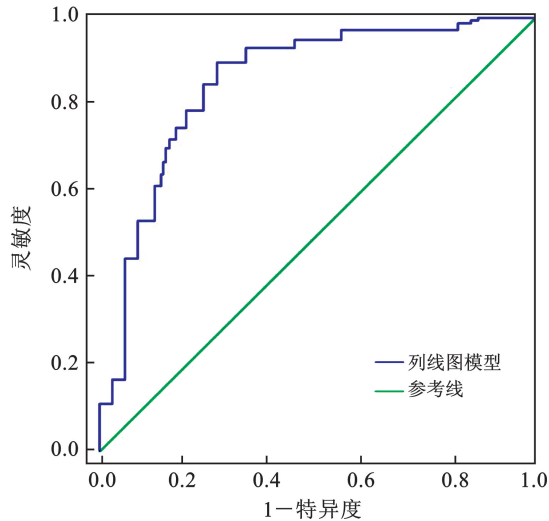


图3 EMS患者预后复发列线图模型的ROC曲线

Fig.3 ROC curve of the nomogram model for prognosis and recurrence in EMS patients

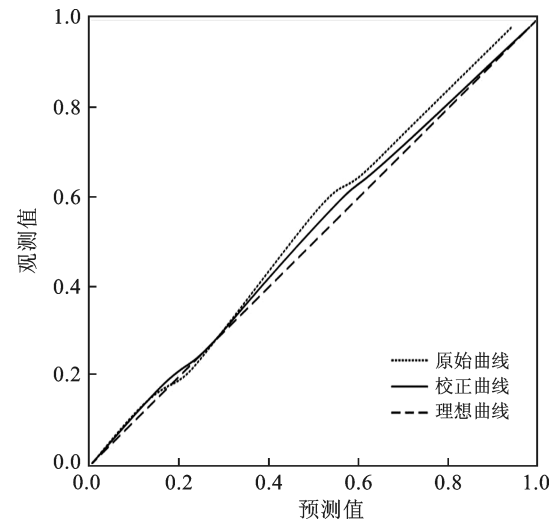


图4 EMS患者预后复发列线图模型的校准曲线

Fig.4 Calibration curve of the nomogram model for prognosis and recurrence in EMS patients

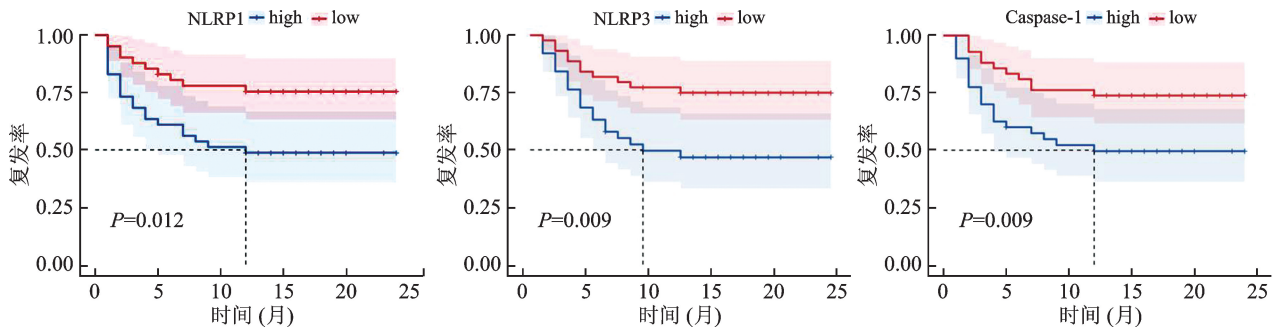


图5 NLRP1、NLRP3 和 Caspase-1 不同表达情况与 EMS 患者术后复发的关系

Fig.5 Relationship between the differential expression of NLRP1,NLRP3,and Caspase-1 and postoperative recurrence in EMS patients

3 讨论

3.1 EMS 中 NLRP1 和 NLRP3 及 Caspase-1 的表达

EMS 的发病原因涉及到遗传、内分泌、免疫、炎症及环境等多方面的因素,但目前尚不确定 EMS 发病的具体原因。炎症小体可以对病原体和损伤相关分子模式的不同刺激信号进行识别,参与细胞焦亡及多种炎症反应^[5-6]。炎症小体包括 NLRP1、NLRP3和 NLRP7 等,其中炎症小体 NLRP3 参与多种疾病相关的炎症反应^[7],可以检测各种有害刺激,如细菌、病毒等病原体,以及组织损伤信号,修复受损组织^[8]。炎症小体 NLRP3 可被多种信号激活,随经血逆流至腹腔的异位内膜组织过表达 β 雌激素受体(estrogen receptor β , ER β),ER β 与 NLRP3 炎症

小体结合并激活 Caspase-1,引起 Caspase-1 活化,释放 IL-1 β 、IL-18^[9],炎症小体 NLRP1 与 NLRP3 作用类似,其活化后可促进 IL-1 β 、IL-18、IL-33 等炎症因子的成熟和释放,诱发炎症级联反应,最终导致组织损伤^[10-11]。IL-1 β 可以扩大局部炎症反应的信号传导,进一步介导子宫内膜细胞的黏附、增殖与侵袭,最终导致 EMS 在宫腔外的发生及发展^[12-14]。本研究发现,不同严重程度患者异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量差异均有统计学意义,研究组Ⅲ期和Ⅳ期的 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量均明显高于对照组。NLRP1 和 NLRP3 能够感知细胞内的危险信号并激活炎症小体,进而触发炎症反应。持续的炎症反应是 EMS 发生和发展的重要机制之一。因此,随着病情的加重,NLRP1 mRNA 和 NLRP3 mRNA

表达量增加,以响应和调控炎症反应。Caspase-1 作为炎症小体激活后的下游效应分子,在炎症反应中起着至关重要的作用,其能够切割并激活多种促炎因子,如 IL-1 β 和 IL-18 等,从而放大炎症反应。刘敏等^[15]的研究也有类似发现,EMS 中重度患者组血清半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶显著高于轻度患者组和对照组。

3.2 EMS 患者预后复发与 NLRP1、NLRP3 及 Caspase-1 的关系

腹腔镜手术是 EMS 的首选治疗方法,手术治疗仅能清除肉眼可见的病灶,对于肉眼无法辨认的微小病灶难以彻底清除,导致手术后可能会出现复发、加重的情况^[16];其严重影响了患者的健康和生活质量,同时进一步增加了治疗的难度^[17-18]。因此,寻找与 EMS 患者腹腔镜手术治疗预后复发相关的指标尤为必要。本研究显示,复发组患者异位内膜组织中 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量均明显高于未复发组,其均为 EMS 患者预后复发的独立危险因素。王诗瑶等^[2]关于炎性小体与 EMS 关系的研究中也有类似发现。本研究中采用 RCS 模型分析 NLRP1mRNA、NLRP3mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量与 EMS 预后复发的关系发现,随着 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量的增高,EMS 预后复发的风险也逐渐升高,同时还发现 EMS 严重程度分期为 III~IV 期也会明显影响 EMS 预后复发。这与 Kor 等^[19]的研究结果基本一致。EMS 严重程度分期是其预后复发的独立危险因素,其中 III~IV 期的患者预后复发率更高。

综上所述,EMS 严重程度分期为 III~IV 期 EMS 患者异位内膜组织中的 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量均明显高于 I~II 期,这可能是 EMS 严重程度的可靠指标。随着 NLRP1 mRNA、NLRP3 mRNA 及 Caspase-1 mRNA 表达量升高,EMS 患者预后复发的危险性随之升高。EMS 严重程度分期、生殖道感染、NLRP3 mRNA、NLRP3 mRNA 和 Caspase-1 mRNA 表达量均是 EMS 患者预后复发的独立危险因素。本研究的样本数量具有一定的局限性,未来的研究

中将扩大样本量,尽可能补足欠缺之处,以期为临床提供更加精准的数据支持。

【参考文献】

- [1]刘娟,李冰,唐妮,等.血清 VCAM-1,PAI-1 水平对子宫内
膜异位症患者腹腔镜手术治疗预后的影响[J].中国性科
学,2022,31(2):4.
- [2]王诗瑶,孙贇.NLRP3 炎症小体/IL-1 β 信号通路在子宫内
膜异位症中的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2021,48
(6):5.
- [3]黄丰泽,梁万旺,孙达欣.NLRP1 炎症小体与肿瘤研究进
展[J].中国癌症防治杂志,2020,12(5):594-598.
- [4]欧海燕,段娅娟,陈兰.外周血单核细胞 NLRP3 炎性小体
对脓毒症急性肺损伤患者病情严重程度的诊断价值[J].
实用医学杂志,2020,36(3):5.
- [5]Ball E,Karavadra B,Kremer-Yeatman B J,et al.System-
atic review of patient-specific predictors of pain im-
provement to endometriosis surgery[J].Reprod Fertil,
2021,2(1):69-80.
- [6]周静,王显鹤.NLRP1 炎症小体及其在中枢神经系统疾病
中的作用[J].医学信息,2020,33(23):3.
- [7]Chen Y M,Wu D,Sun L J.Clinical significance of high-
mobility group box 1 protein (HMGB1) and nod-like re-
ceptor protein 3 (NLRP3) in patients with ulcerative co-
litis[J].Med Sci Monit,2020,26:e919530.
- [8]Li Z,Guo J,Bi L.Role of the NLRP3 inflammasome in
autoimmune diseases[J].Biomed Pharmacother,2020,
130:110542.
- [9]Paik S,Jin K K,Silwal P,et al.An update on the regu-
latory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation
[J].Cell Mol Immunol,2021,18(5):1141-1160.
- [10]吴晓蕊,靳荣,卢慧.子宫内膜癌病变中细菌感染及异位
内膜组织 NLRP3 炎症小体-IL-1 β 的表达[J].中华医院
感染学杂志,2022,32(23):3633-3637.
- [11]李潇,刘欣,宋亚华,等.NLRP1 及 NLRP3 在溃疡性结
肠炎患者结肠组织中的表达及其临床意义[J].西安交通
大学学报(医学版),2021,42(1):75-80,112.
- [12]Vijayaraj S L,Feltham R,Rashidi M,et al.The ubiq-
uitylation of IL-1 β limits its cleavage by caspase-1 and
targets it for proteasomal degradation[J].Nat Com-
mun,2021,12(1):2713.
- [13]刘娟,任慕兰.二噁英对小鼠异位子宫内中 IL-1 β 表达
的影响[J].中国妇幼健康研究,2011,22(2):162-164.

- [14]de Rivero Vaccari J P.The inflammasome in reproductive biology;a promising target for novel therapies[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2020,11:8.
- [15]刘敏,刘学武,李子军,等.血清半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 膜联蛋白 A2 及 Fas 配体水平在预测子宫内膜异位症严重程度中的作用[J].中国妇幼保健,2022,37(22):4.
- [16]Loring M,Kabelac Z,Munir U,et al.Novel technology to capture objective data from patients' recovery from laparoscopic endometriosis surgery[J].J Minim Invasive Gynecol,2021,28(2):325-331.
- [17]Sun T T,Chen S K,Li X Y,et al.Fertility outcomes after laparoscopic cystectomy in infertile patients with stage III-IV endometriosis;a cohort with 6-10 years of follow-up[J].Adv Ther,2020,37(5):2159-2168.
- [18]Parra R S,Feitosa M R,Camargo H,et al.The impact of laparoscopic surgery on the symptoms and wellbeing of patients with deep infiltrating endometriosis and bowel involvement[J].J Psychosom Obstet Gynaecol, 2021,42(1):75-80.
- [19]Kor E,Mostafavi S,Mazhin Z A,et al.Relationship between the severity of endometriosis symptoms (dyspareunia,dysmenorrhea and chronic pelvic pain) with the spread of the disease on ultrasound[J].BMC Res Notes, 2020,13(1):546.

[专业责任编辑:薛 艳]

[中文编辑:王 懿;英文编辑:刘昕田]

加强编辑部诚信建设的要求

为了落实《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》,我刊特提出以下要求:

- 1.《中国妇幼健康研究》编辑部的全体成员应认真学习文件精神,全面落实文件提出的要求;为进一步加强科研诚信建设,营造诚实守信的良好科研环境而努力。
- 2.认真贯彻文件精神,坚持自律与监督并重,认真自查本刊在既往工作中是否存在违背科研诚信要求的行为,立即进行整改工作。
- 3.加强论文的质量把关、审核工作。对抄袭、剽窃他人论文、篡改研究数据、弄虚作假的文章,一经发现,立即撤回,并将情况反馈到作者单位。该作者两年内不得在本刊发表论文。
- 4.要求文章作者在投稿的同时,应对论文的诚信签署“承诺书”,明确承诺文章的真实性和实践性。对待存在有疑问数据的文章,本刊有责任要求作者所在单位附上证明文书。
- 5.《中国妇幼健康研究》对有关涉及伦理方面的文章,必须经该单位“医学伦理委员会”审核通过,并征得患者和家属的知情同意。
- 6.作者投稿需在我刊官网进行在线注册,坚决杜绝从事论文买卖、代写代投以及伪造、虚构数据的中介服务稿件来源。如果发现编辑部有人有此行为,将严肃处理。
- 7.加强编辑部自身建设,进一步完善编辑部审稿程序,扩大专业审稿队伍,切实提高审稿质量,加强对学术论文的审核把关。完善责任追究制度,对编辑部审稿、刊发过程中出现的违背诚信、造成后果的事实,将严格追究当事人员的责任。

《中国妇幼健康研究》编辑部

2024 年 11 月 12 日